

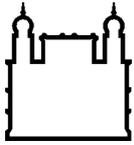
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS DO GRUPO A EM AMOSTRAS FECAIS:
ADAPTAÇÃO DO TESTE DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA O
EMPREGO DE ANTICORPOS IGY ANTI-ROTAVÍRUS A

NATÁLIA MARIA LANZARINI

Rio de Janeiro
2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

NATÁLIA MARIA LANZARINI

Detecção de rotavírus do grupo A em amostras fecais: Adaptação do teste de aglutinação em látex para o emprego de anticorpos IgY anti-Rotavírus A

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

Orientador: Dr. Marcelo Alves Pinto

RIO DE JANEIRO

2014

ii

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

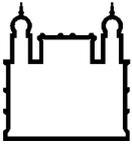
L297 Lanzarini, Natália Maria

Detecção de rotavírus do grupo A em amostras fecais: adaptação do teste de aglutinação em látex para o emprego de anticorpos IgY anti-Rotavírus A / Natália Maria Lanzarini. – Rio de Janeiro, 2014.
xvii,75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.
Bibliografia: f. 62-73

1. Teste de aglutinação em látex. 2. Imunoglobulina Y. 3. Rotavírus.
I. Título.

CDD 579.254



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: NATÁLIA MARIA LANZARINI

Detecção de rotavírus do grupo A em amostras fecais: Adaptação do teste de aglutinação em látex para o emprego de anticorpos IgY anti-Rotavírus A

ORIENTADOR: Dr. Marcelo Alves Pinto

EXAMINADORES:

Dr^a. Flavia Barreto dos Santos - Presidente e Revisor (IOC/FIOCRUZ)

Dr^a. Silvia Maria Baeta Cavalcanti - Membro Permanente
(Departamento de Microbiologia e Parasitologia/UFF)

Dr^a. Mônica Santos de Freitas - Membro Permanente
(Instituto de Bioquímica Médica/UFRJ)

Dr. Tulio Machado Fumian - Suplente (IOC/FIOCRUZ)

Dr. Salvatore Giovanni de Simone - Suplente (IOC/FIOCRUZ)

Dedico esse trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador Dr. Marcelo Alves Pinto, pela paciência e dedicação em me orientar.

Aos membros da banca: Dr^a. Flavia Barreto dos Santos, por aceitar também revisar a dissertação, a Dr^a. Silvia Maria Baeta e Dr^a. Mônica Santos de Freitas. E aos suplentes Dr. Tulio Machado Fumian e Dr. Salvatore Giovanni de Simone.

Ao aluno de doutorado Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos, pela cooperação e por sempre me ajudar quando precisei.

Aos pesquisadores do Laboratório de Virologia Comparada, Dr. Eduardo de Mello Volotão e Dr. José Paulo Gagliardi e pela colaboração para que esse projeto se concretizasse.

Ao pesquisador da Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Dr. Luiz Guilherme Dias Heneine pela colaboração durante o projeto.

Aos companheiros do Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Noemi Rovaris, Juliana Melgaço, Yasmine, agregada Fabiana Melgaço, Paula, Amanda e Renata, que fizeram meus dias do Mestrado mais felizes.

Aos chefes de laboratório e aos membros do Laboratório de Virologia Comparada, Laboratório de Enterovírus, Laboratório de Virologia Molecular, Laboratório de Hepatites Virais e Laboratório de Hantaviruses e Rickettsioses por sempre me ajudarem quando precisei.

Aos meus queridos amigos Alexandre, Juliana, Lyana e Diana, vocês são essenciais. Especialmente, aos amigos que são como irmãos (Luanda), pais (Alexandre), mães (Juliana, Dadade) e que sempre estão cuidando de mim.

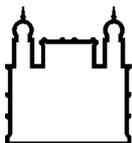
Ao meu namorado Jorlan Fernandes, por sempre estar presente na minha vida nos momentos bons e ruins, por ser tão especial, por me completar, me amar incondicionalmente e ser a razão do meu viver.

Aos amigos do Colégio da Companhia de Maria, da IFRJ e do Colégio Pedro II por me acompanharem sempre e aos meus queridos amigos da UFF, muito importantes na minha vida.

À minha família ímpar: meus pais Wilson e Vergínia, meus irmãos Juliana, Cássia, Cíntia, Tomás, Vítor e Pedro, e aos meus queridos sobrinhos Lorenzo e Maria Fernanda.

In memoriam: Natália Soares e Vô Grandão...que descansem em paz.

Campeões não são feitos em academias. Campeões são feitos de algo que eles têm profundamente dentro de si – um desejo, um sonho, uma visão. (Muhammad Ali)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

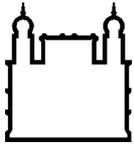
DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS DO GRUPO A EM AMOSTRAS FECAIS: ADAPTAÇÃO DO TESTE DE AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX PARA O EMPREGO DE ANTICORPOS IGY ANTI-ROTAVÍRUS A

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Natália Maria Lanzarini

A infecção pelo rotavírus A (RVA) é responsável por cerca de 453.000 mortes anualmente e aproximadamente 40% das hospitalizações por diarreia em crianças menores de cinco anos em todo o mundo, sendo o principal causador de gastroenterite aguda nesse grupo populacional. O desenvolvimento de um método de diagnóstico rápido, barato, sensível e específico para a detecção de RVA é importante do ponto de vista epidemiológico porque permite identificar surtos no local de ocorrência. O uso da imunoglobulina Y (IgY), anticorpo purificado a partir da gema de ovo, vem crescendo nos últimos anos, devido às características vantajosas quando comparada com a imunoglobulina G (IgG), como a obtenção de anticorpos de forma não invasiva e a produção de anticorpos em grandes concentrações. Este trabalho objetivou a adaptação de um teste de diagnóstico através da substituição do anticorpo de captura IgG pela IgY específica para o antígeno de RVA (LATEXY-ROTA). Para isto 09 frangas poedeiras foram imunizadas com o RVA, os ovos foram coletados e a IgY purificada a partir da gema do ovo por polietileno glicol 6.000, seguida da purificação adicional por cromatografia de troca iônica. A IgY anti-RVA purificada foi ligada covalentemente à partículas de poliestireno e usada como insumo na adaptação de um teste de aglutinação em látex, sendo testada em um painel de amostras fecais sabidamente positivas e negativas previamente selecionadas pelo Centro Regional de Referência para Rotavirose do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA/IOC-FIOCRUZ). Foi obtida uma sensibilidade de 75% e uma especificidade de 87,5% quando o LATEXY-ROTA foi comparado com um teste imunoenzimático comercial disponível (padrão ouro). Quando comparado com dois testes comerciais de aglutinação em látex testados no painel de amostras utilizando a IgG, o LATEXY-ROTA obteve uma sensibilidade de 100% e especificidade de 88,24%. Baseado nos dados obtidos, sugerimos a viabilidade da substituição da IgG por IgY no ensaio de aglutinação pelo látex.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DETECTION OF GROUP A ROTAVIRUS IN FECAL SAMPLES: ADAPTATION OF LATEX AGGLOUTINATION TEST FOR ANTI-ROTAVIRUS A IGY ANTIBODY EMPLOYMENT

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITORY BIOLOGY

Natália Maria Lanzarini

The infection by rotavirus (RV) is responsible for approximately 453,000 deaths annually and approximately 40% of hospitalizations by diarrhea in children under five years worldwide, being the major cause of acute gastroenteritis in this population group. The development of a rapid method, inexpensive, sensitive and specific for rotavirus diagnosis is important from the disease because it allows the identification of outbreaks in the site of occurrence. The use of Immunoglobulin Y (IgY) antibody purified from egg yolk, has been grown in recent years, due to the advantageous features compared to immunoglobulin G (IgG), as a noninvasive recovery of antibodies and production in high concentrations. The aim of this method was to adapt a diagnostic test by replacing the IgG capture antibody by specific IgY for RVA antigen (LATEXY-ROTA). For that, 09 laying hens were immunized with RVA, the eggs were collected and IgY purified from egg yolk by polyethylene glycol 6,000, followed by purification by ion exchange chromatography. The purified anti-IgY RVA was covalently bound to polystyrene particles, being tested in a panel of positive and negative fecal samples previously determined by the Rotavirus Regional Reference Center of Comparative and Environmental Virology Laboratory (LVCA/IOC-FIOCRUZ). A sensitivity of 75% and specificity of 85,7% was observed when the adapted test was compared to a commercial available enzyme immunoassay (golden standard). When compared to two commercial latex agglutination tests using the IgG tested on the panel of samples, the LATEXY-ROTA had a sensitivity of 100% and specificity of 88.2%. Based on the obtained data, we suggest the feasibility of replacing the IgG by IgY in the latex agglutination assay.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Rotavírus	1
1.2 Replicação do rotavírus	3
1.3 Patogenia do rotavírus	5
1.4 O papel da imunidade de mucosa na infecção por rotavírus	6
1.5 Epidemiologia do rotavírus	7
1.6 Prevenção e controle da infecção por rotavírus	8
1.7 Diagnóstico laboratorial da infecção por rotavírus	12
1.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	13
1.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	14
1.7.4 Testes imunocromatográficos	14
1.7.5 Testes de aglutinação em látex	15
1.8 Síntese de anticorpos pelas aves	17
1.8.1 Imunoglobulina Y	18
1.8.2 Características da IgY	19
1.8.3 Produção de anticorpos IgY específicos	20
1.8.4 Aplicação da IgY em diagnóstico e tratamento	22
1.9 Justificativa	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Produção e purificação de rotavírus em cultura de células	27
3.2 Imunização das aves	28
3.3 Purificação da IgY por polietilenoglicol (PEG)	29
3.4 Quantificação da IgY	30
3.5 Caracterização da IgY por SDS-PAGE	31

3.6	Determinação da especificidade da IgY ao rotavírus por Western Blotting.....	31
3.7	Purificação adicional da IgY anti-RVA por cromatografia de troca iônica	32
3.8	Conjugação da IgY anti-RVA à partículas de poliestireno.....	33
3.9	Teste de aglutinação em látex utilizando a IgY (LATEXY-ROTA).....	34
3.10	Painel de amostras.....	35
3.11	Análise estatística	35
4	RESULTADOS	38
4.1	Produção e purificação de rotavírus por cultura de células.....	38
4.2	Imunização das aves.....	38
4.2.1	Peso das aves	38
4.2.2	Número de ovos coletados	39
4.3	Purificação da IgY por PEG e quantificação da IgY	40
4.4	Caracterização da IgY por SDS-PAGE.....	41
4.5	Determinação da especificidade da IgY ao rotavírus por Western Blotting.....	42
4.6	Purificação adicional da IgY anti-RVA por cromatografia de troca iônica	43
4.7	Conjugação da IgY anti-RVA a partículas de poliestireno e visualização da aglutinação no LATEXY-ROTA.....	44
4.8	Avaliação da aglutinação do LATEXY-ROTA em um painel de amostras	45
4.9	Comparação da reação de aglutinação em imunoenaios comerciais utilizando IgG	46
4.10	Avaliação da sensibilidade e especificidade do LATEXY-ROTA.....	47
4.11	Análise estatística	48
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES	60
7	PERSPECTIVAS	61
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9	ANEXO: COMITÊ DE ÉTICA NO TRATO DE ANIMAIS - UNIFESO	74
10	ANEXO: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – FIOCRUZ	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Organização estrutural do rotavírus. A: Micrografia eletrônica do rotavírus. B: Gel de poliacrilamida demonstrando os 11 segmentos de RNA de RV com as respectivas proteínas que eles codificam. C e D: Representação da estrutura do RV.....	2
Figura 2: Ciclo replicação do rotavírus.....	4
Figura 3: Taxa de mortalidade de rotavírus em crianças menores que cinco anos.....	9
Figura 4: Países com programas nacionais de imunização contra rotavírus....	10
Figura 5: Comparação entre as estruturas moleculares da IgG de coelho (A) e da IgY de ave (B).....	20
Figura 6: População de frangas poedeiras mantidas individualmente no Laboratório de Bioclimatologia na Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Serra dos Órgãos (UNIFESO) para imunização com RVA.....	29
Figura 7: Esquema representativo da ligação covalente entre o carboxi-látex e a IgY.....	34
Figura 8: Purificação de RVA por gradiente de cloreto de cério (CsCl).....	38
Figura 9: Acompanhamento do peso médio das aves após imunizações com RVA e controle.....	39
Figura 10: Distribuição do número de ovos coletados por grupo experimental nas 13 semanas após a imunização com RVA.....	40
Figura 11: Concentração de IgY anti-RVA purificada da gema do ovo durante 13 semanas após a imunização (<i>pool</i> por semana).....	41
Figura 12: Gel SDS PAGE 12% da IgY purificada por PEG 6.000 do Grupo I, com três imunizações de RVA.....	42
Figura 13: Western Blotting para determinação da especificidade da IgY anti-RVA.....	42
Figura 14: Absorbâncias das frações purificadas da IgY anti-RVA por Sepharose CL-6B.....	43
Figura 15: SDS PAGE 12% da IgY purificada por coluna de Sepharose CL-6B.....	44

Figura 16: Ensaio de aglutinação em látex utilizando a IgY anti-RVA.....	44
Figura 17: Reação de aglutinação no LATEXY-ROTA.....	45
Figura 18: Reação de aglutinação de amostras nos imunoenaios comerciais de aglutinação em látex.....	46
Figura 19: Curva ROC da comparação do LATEXY-ROTA com o Diagnóstico de Referência.....	49
Figura 20: Curva ROC da comparação do LATEXY-ROTA com o Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil).....	51
Figura 21: Curva ROC da comparação do LATEXY-ROTA com o Virotec Rota (Meridian Bioscience, EUA).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estratégia de imunização de frangas poedeiras com RVA e grupo controle.....	29
Tabela 2: Comparação dos resultados de aglutinação em látex obtidos do látex utilizando a IgY (LATEXY-ROTA) com testes disponíveis comercialmente.....	48
Tabela 3: Relação entre os resultados positivos e negativos da reação de aglutinação em látex do LATEXY-ROTA, quando comparada com o Diagnóstico de Referência.....	48
Tabela 4: Desempenho do teste de aglutinação em látex utilizando a IgY anti-RVA (LATEXY-ROTA) em comparação com o Diagnóstico de Referência	50
Tabela 5: Relação entre os resultados positivos e negativos da reação de aglutinação do LATEXY-ROTA, quando comparada com o Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil).....	50
Tabela 6: Desempenho do teste de aglutinação em látex utilizando a IgY anti-RVA (LATEXY-ROTA) com o imunoensaio comercial Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil).....	51
Tabela 7: Relação entre os resultados positivos e negativos da reação de aglutinação do LATEXY-ROTA, quando comparada com o Virotect Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido):	52
Tabela 8: Desempenho do teste de aglutinação em látex utilizando a IgY (LATEXY-ROTA) em comparação com o imunoensaio comercial Virotect Rota (Meridian Bioscience, EUA):.....	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- BCA – Ácido Bicinconínico
- BSA – Albumina de soro bovino
- CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
- CETA - Comitê de Ética no Trato com Animais
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CDC – Do termo inglês *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
- CFA – Adjuvante completo de Freund
- CoCl₂ – Cloreto de cobalto
- CpG-ODN – Oligodesoxinucleotídeos contendo C-fosfato-guanosina
- DAB – 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto
- DLP's – Do termo inglês *double layer particles* (partículas de duplo capsídeo)
- EIA – Ensaio imunoenzimático
- EVCAM – Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos
- FcRY – Receptor Fc da gema do ovo
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- FR – Fator reumatóide
- FRhK-4 – Células de rim de macacos rhesus
- g – grama
- g* – Força G
- H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
- HAMA – Anticorpos anti-mouse produzidos em humanos
- HAV – Vírus da hepatite A
- HBV – Vírus da hepatite B
- HCV – Vírus da hepatite C
- HPV – Papilomavírus Humano
- IFA – Adjuvante incompleto de Freund
- IgA – Imunoglobulina A
- IgG – Imunoglobulina G
- IgM – Imunoglobulina M
- IgY – Imunoglobulina Y
- kb - Kilobase

kDa – kiloDalton
kg – quilograma
M – Molar
mM – miliMolar
mg - Miligrama
mL – Mililitro
nm – Nanômetro
NSP – Do termo inglês *non-structural protein* (proteína não estrutural)
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – Solução Salina tamponada com Fosfato
PBST – Solução Salina tamponada com Fosfato + Tween 20
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PEG – Polietilenoglicol
pH – Potencial hidrogeniônico
RNA – Ácido ribonucleico
fsRNA – Ácido ribonucleico de fita simples
fdRNA – Ácido ribonucleico de fita dupla
RT-PCR – PCR por transcrição reversa
RV – Rotavírus
RVA – Rotavírus do Grupo A
SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio
SNC – Soro normal de cabra
TLR – Receptor “Toll-like”
TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
UNIFESO - Centro Universitário Serra dos Órgãos
V – Volt
VP - Do termo inglês *viral protein* (proteína viral)
 μ L – Microlitro
 μ m – Micrômetro

1 INTRODUÇÃO

A gastroenterite é definida como uma patologia do trato gastrointestinal que pode ser causada por vírus, bactérias ou toxinas. Os sinais e sintomas específicos incluem o aparecimento de diarreia acompanhado ou não de dor abdominal, febre, anorexia, náuseas e vômitos. As gastroenterites virais agudas são as maiores causas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo a infecção por rotavírus (RV) a mais prevalente, seguida pelos norovírus, adenovírus entéricos e astrovírus, respectivamente (Clark e Mckendrick, 2004; Ramani e Kang, 2009).

1.1 Rotavírus

O primeiro estudo com rotavírus foi realizado em 1969, onde Mebus e colaboradores reproduziram infecções clínicas e subclínicas de diarreia aguda em bezerros jovens após inoculação com rotavírus bovino, demonstrando sua presença nas fezes desses animais (Mebus, 1969).

O rotavírus humano foi identificado pela primeira vez em 1973 por microscopia eletrônica em material de biópsia intestinal de crianças hospitalizadas. O nome rotavírus foi designado devido ao fato do vírus ser semelhante a uma roda de carroça quando visualizado no microscópio eletrônico (Figura 1A). (Bishop *et al.*, 1973; Flewett, Bryden e Davies, 1973). No Brasil, o primeiro relato de infecção por rotavírus foi realizado em 1976 por microscopia eletrônica a partir de fezes de crianças com diarreia (Linhares *et al.*, 1977).

O RV pertence à família *Reoviridae*, possui aproximadamente 75 nm de diâmetro, não apresenta envelope e tem simetria icosaédrica. O vírus apresenta um triplo capsídeo: um externo, um intermediário e um interno, chamado *core*, que circunda o genoma viral. O material genético do rotavírus é composto por 11 segmentos de RNA de fita dupla, codificando proteínas estruturais e não estruturais. As seis proteínas estruturais são designadas como: VP1-4, VP6-7; e as seis proteínas não estruturais, definidas como NSP1-6. O capsídeo externo é composto pelas proteínas VP4 e VP7, e o capsídeo intermediário pela proteína VP6 (Figuras 1B, 1C e 1D).

Estável entre pH 3 e 9, é resistente ao éter, clorofórmio e freon, e é sensível à formalina, cloro, betapropiolactona, etanol 95% e glutaraldeído (Flores, 2012).

Sua classificação é dividida em oito grupos (A-H), de acordo com as propriedades antigênicas da proteína VP6 (Matthijnssens *et al.*, 2012; Than e Kim, 2013). Quanto ao genótipo, o rotavírus pode ser classificado de acordo com a sequência genética que codifica a proteína VP7 (com os tipos definidos pela sigla G, diferenciados em 23 G), e a proteína VP4 (com os tipos definidos pela sigla P, diferenciados em 32 P), no formato GxP[x] (Assis *et al.*, 2013).

Outra classificação, mais atual, proposta pelo *Rotavirus Classification Work Group* (RCWG), pretende uniformizar a nomenclatura de rotavírus, utilizando o sequenciamento completo ou parcial de todos os 11 segmentos do material genético para classificar em genótipos: Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, que representam os genes VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5-NSP6. A partir desses dados, os rotavírus serão nomeados da seguinte forma: grupo do rotavírus/espécie de origem/país de identificação/nome comum/ano de identificação/tipo G e P (Matthijnssens *et al.*, 2011).

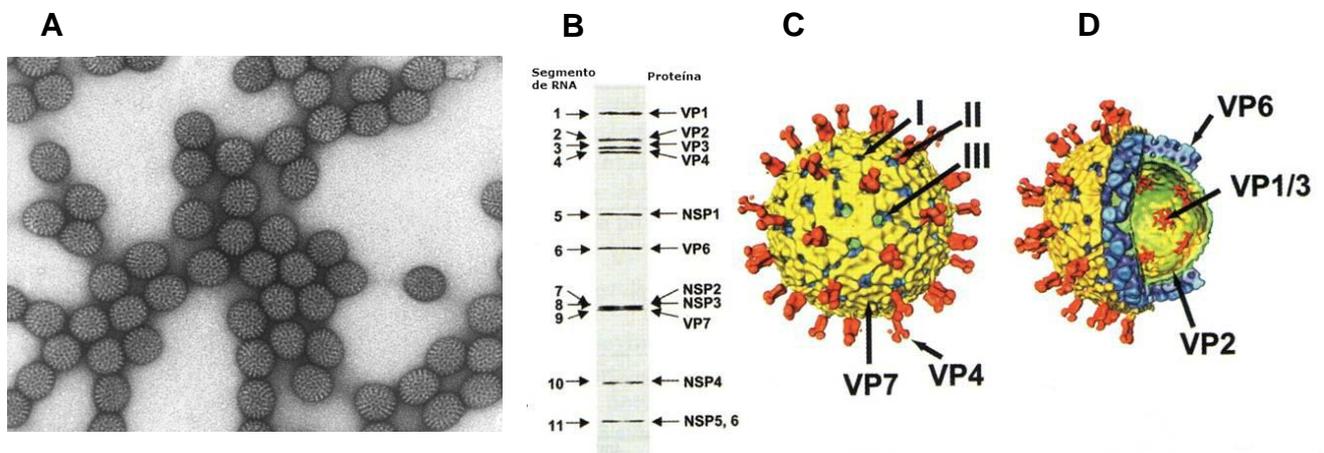


Figura 1: Organização estrutural do rotavírus. **A:** Micrografia eletrônica por contrastação negativa do rotavírus (CDC, Dr. Erskine Parmer, 1978). **B:** Gel de poliacrilamida demonstrando os 11 segmentos de RNA de RV com as respectivas proteínas que eles codificam. **C:** Representação da estrutura do RV, com as proteínas VP4 (vermelho) e VP7 (amarelo) do capsídeo externo. **D:** Proteína VP6 (azul) do capsídeo intermediário, a proteína do core VP2 (verde), e o complexo VP1/3 inserido na proteína VP2 (Desselberger *et al.*, 2009).

1.2 Replicação do rotavírus

Para estudar o mecanismo de replicação do rotavírus, a linhagem celular utilizada é a MA-104, derivada do rim fetal de macaco *Rhesus*. O rotavírus infecta os enterócitos das vilosidades do intestino delgado e replica exclusivamente no citoplasma celular (Figura 2) (Trask, Mcdonald e Patton, 2012).

O vírion precisa se ligar à célula-alvo, porém, a partícula recém-montada não é infecciosa para penetrar pela membrana, sendo necessário que a proteína VP4 do capsídeo externo seja clivada em dois fragmentos: VP8* (28 KDa) e VP5* (60 KDa), por proteases semelhantes à tripsina presentes no trato gastrointestinal do hospedeiro. Uma endocitose independente de clatrina e caveolina permite que o vírion forme o endossomo inicial. Nesse local, a queda da concentração de cálcio leva à perda da proteína VP7 e à penetração na membrana pela VP5*. Essa perda do capsídeo externo e liberação da partícula de duplo capsídeo (DLP) no citosol ativa o complexo polimerase interno (VP1 e VP3) para transcrever a fita de RNA polaridade positiva (RNA+) de cada um dos 11 segmentos genômicos de RNA de fita dupla (RNAfd) (Trask, Mcdonald e Patton, 2012).

O RNA+ serve tanto como RNA mensageiro (RNAm) para a síntese de proteínas virais pelo ribossomo celular quanto molde para a síntese da fita de RNA de polaridade negativa (RNA-) durante a replicação do genoma (Trask, Mcdonald e Patton, 2012).

A proteína não estrutural 2 (NSP2) e a NSP5 formam grandes inclusões (viroplasmias) que sequestram os componentes necessários para a replicação do genoma e montagem das partículas subvirais. A síntese do genoma se inicia quando a VP1 e a VP3 se ligam ao terminal 3' do RNA+ viral. A condensação da proteína do capsídeo interno VP2 em torno do complexo de polimerase desencadeia a síntese de RNAfd pela VP1. A proteína do capsídeo intermediário VP6 agrega o core para formar a DLP (Trask, Mcdonald e Patton, 2012).

A montagem do capsídeo externo não é bem compreendida, mas o modelo atual propõe que a interação entre a proteína transmembrana de rotavírus NSP4 recruta a DLP e a proteína VP4 para a região citosólica da membrana do retículo endoplasmático (RE). O complexo DLP-NSP4-VP4 então se liga ao RE e a ligação da proteína VP7 do capsídeo externo permite a formação da partícula de camada

tripla (TLP), que é liberada por lise ou excitose. A liberação da partícula da célula infectada expõe o vírion às proteases semelhantes à tripsina, clivando a VP4 e reiniciando o ciclo de replicação (Trask, Mcdonald e Patton, 2012).

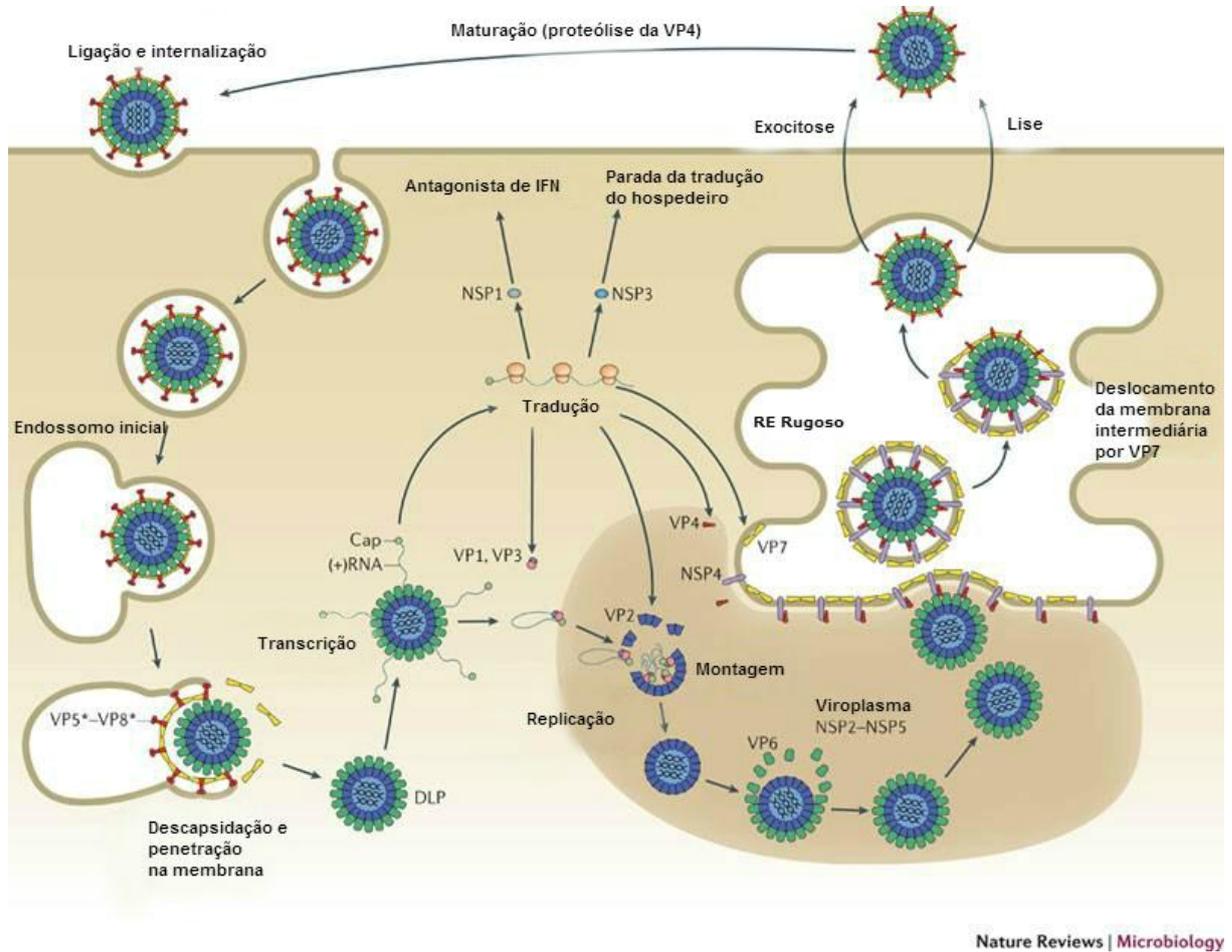


Figura 2: Ciclo replicação do rotavírus: As fases de replicação do rotavírus incluem a maturação (proteólise da VP4), ligação e internalização, formação do endossomo inicial. Descapsidação e penetração na membrana, formação da DLP, transcrição, tradução, replicação e montagem das novas partículas virais, que podem ser liberadas por lise ou excitose (Trask, Mcdonald e Patton, 2012). DLP: partícula de duplo capsídeo; VP1-VP8: proteínas virais do rotavírus; NSP1-NSP5: proteínas não estruturais do rotavírus; RE Rugoso: Retículo Endoplasmático Rugoso; Cap (+)RNA: ácido ribonucleico de polaridade positiva capeado.

1.3 Patogenia do rotavírus

A transmissão do rotavírus ocorre pela via fecal-oral e pela ingestão de água e alimentos contaminados. Logo após a ingestão, o rotavírus atinge a luz intestinal, onde possui tropismo pelas células do intestino delgado, penetrando nos enterócitos maduros na região apical das vilosidades intestinais. A replicação do rotavírus resulta na lise e descamação do epitélio intestinal. O epitélio danificado sofre recomposição pelas células cuboides imaturas, que não possuem capacidade absorptiva e digestiva. Como os enterócitos maduros são responsáveis pela produção da enzima lactase, importantes para a digestão da lactose, com a descamação do epitélio ocorre uma diarreia por má absorção, que piora com a presença da lactose não digerida, que fermentada pela ação de bactérias da microbiota, intensifica o quadro devido ao aumento da pressão osmótica (diarreia osmótica). Em um agravamento do quadro, devido às intensas lesões do epitélio, as células das criptas são afetadas, dificultando a motilidade intestinal, podendo fazer com que as vilosidades atrofiem-se e até fusionem-se. A proteína NSP4 parece atuar como uma enterotoxina e induzir diarreia por hipersecreção, interagindo com um receptor celular do intestino, ativando uma via que aumenta o cálcio (Ca^{2+}) intracelular. O Ca^{2+} aumenta a permeabilidade da membrana plasmática ao cloro, que então acaba sendo secretado. A NSP4 também estimula a secreção de água pelas células intestinais (Flores, 2012).

O período de incubação do rotavírus é de 16 a 24 horas, e logo depois surgem os primeiros sinais de diarreia e o vírus é excretado nas fezes por até sete dias após a infecção. Outros sinais clínicos observados são: depressão, anorexia, vômito e desidratação. Estudos de infecção experimental em macacos cinomolgos realizado pelo Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia - LADTV (dados não publicados) e camundongos BALB/c neonatos também confirmam o período de eliminação viral, podendo este estar acompanhado ou não por diarreia (Kubelka et al., 1994).

1.4 O papel da imunidade de mucosa na infecção por rotavírus

Os mamíferos superiores desenvolveram uma imunidade de mucosa única para proteger a sua vasta superfície, formando a maior área em contato com o ambiente externo, que pode atingir 400 m² em humanos (Mcghee e Fujihashi, 2012).

O complexo sistema imunológico de mucosa deve ser capaz tanto de gerar uma resposta imune eficaz contra patógenos quanto ser tolerante a antígenos presentes nos alimentos. A primeira barreira imunológica da mucosa é formada por um epitélio de camada única coberto por muco e produtos antimicrobianos, que é fortificado pelas respostas inata e adquirida do hospedeiro. A microbiota do hospedeiro participa do processo de imunidade natural e tolerância imunológica, sendo composta por aproximadamente 10¹² bactérias/cm³, incluindo 1.000 espécies bacterianas diferentes, que variam de indivíduo para indivíduo. O sistema imunológico de mucosa, que é composto pelos Órgãos Linfoides Associados à Mucosa (MALT), no trato gastrointestinal é definido como Órgão Linfoide Associado ao Intestino (GALT) (Mcghee e Fujihashi, 2012).

A imunidade de mucosa humoral do trato gastrointestinal é composta predominantemente pela Imunoglobulina A (IgA). O corpo humano produz uma quantidade elevada de IgA (66 mgkg⁻¹dia⁻¹), expressa como um monômero no soro, mas é secretada na forma de um dímero na mucosa. A IgA dimérica se liga ao receptor polimérico de Imunoglobulina (pIgR), expresso na membrana basolateral das células epiteliais da mucosa, de onde é transportado por transcitose pelas células epiteliais e liberado no lúmen como IgA secretória (SIgA). Esse anticorpo tem três funções principais: fisicamente bloquear a adesão do patógeno e sua invasão, reconhecer antígenos estranhos e escoá-los através das células epiteliais, livrando a mucosa do excesso de antígenos, além de interceptar vírus intracelularmente, facilitando sua neutralização e eliminação junto com células infectadas (Bakema e Van Egmond, 2011; Horton e Vidarsson, 2013).

A IgA possui um papel muito importante no estabelecimento da imunidade contra rotavírus. Em um estudo utilizando camundongos nocautes para IgA (IgA^{-/-}) que não possuíam esse anticorpo nem no soro nem secretado na mucosa, foi observado uma dificuldade na eliminação da infecção inicial de rotavírus e na proteção contra a reinfecção. Enquanto o animal selvagem resolvia a infecção em 10

dias, camundongos IgA^{-/-} continuavam liberando o vírus por 20-22 dias. Após 6 e 12 meses, os animais foram reinoculados com rotavírus e, enquanto os animais selvagens estavam protegidos, isto é, não liberavam vírus nas fezes, os animais IgA^{-/-} apresentavam uma carga viral elevada (Blutt *et al.*, 2012).

1.5 Epidemiologia do rotavírus

Os rotavírus são os principais vírus entéricos tanto para humanos quanto animais, estando amplamente disseminados na natureza com uma variedade de hospedeiros suscetíveis à infecção. São vírus primariamente espécie-específicos, mas também ocorrem infecções heterólogas, que se caracteriza pela infecção de um animal por um rotavírus de outra espécie. Um exemplo disso são as infecções com rotavírus de suínos e bovinos em humanos, confirmando o comportamento zoonótico da rotavirose. Os rotavírus também podem passar por um processo de recombinação gênica, quando uma célula é coinfetada por duas ou mais cepas virais distintas, de forma que o produto viral formado contenha diferentes combinações dos genes originais (Flores, 2012).

Os rotavírus do grupo A são os mais importantes do ponto de vista epidemiológico em todo o mundo, sendo responsáveis por 125 milhões de episódios de diarreia, 25 milhões de consultas médicas e 2,4 milhões de hospitalizações. Segundo uma estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS) feita em 2008, cerca de 453.000 mortes por ano no mundo ocorrem devido à infecção por rotavírus em crianças menores de cinco anos. Uma em cada 260 crianças morrerá de diarreia causada por rotavírus antes dos cinco anos (Figura 3) (Tate *et al.*, 2012).

Em países em desenvolvimento, é observada uma elevada mortalidade e morbidade devido à alta hospitalização causada pela diarreia e desidratação. Só na América Latina, são estimados 10 milhões de casos de diarreia, dois milhões de consultas médicas, 75.000 hospitalizações e 15.000 mortes anuais causadas pelo rotavírus do grupo A (Assis *et al.*, 2013).

No Brasil, a rotavirose, por se tratar de uma doença de grande magnitude, é de notificação compulsória e, segundo o Ministério da Saúde, foram notificados 9.812 casos suspeitos no país de 2006 a 2012, sendo 2.347 casos confirmados, o que representa uma positividade de 23,9%. A vigilância epidemiológica é de extrema

importância para avaliar os perfis de genótipos de rotavírus circulantes, promover medidas de prevenção e controle e para verificar a eficácia da vacina e seu aperfeiçoamento (Assis *et al.*, 2013).

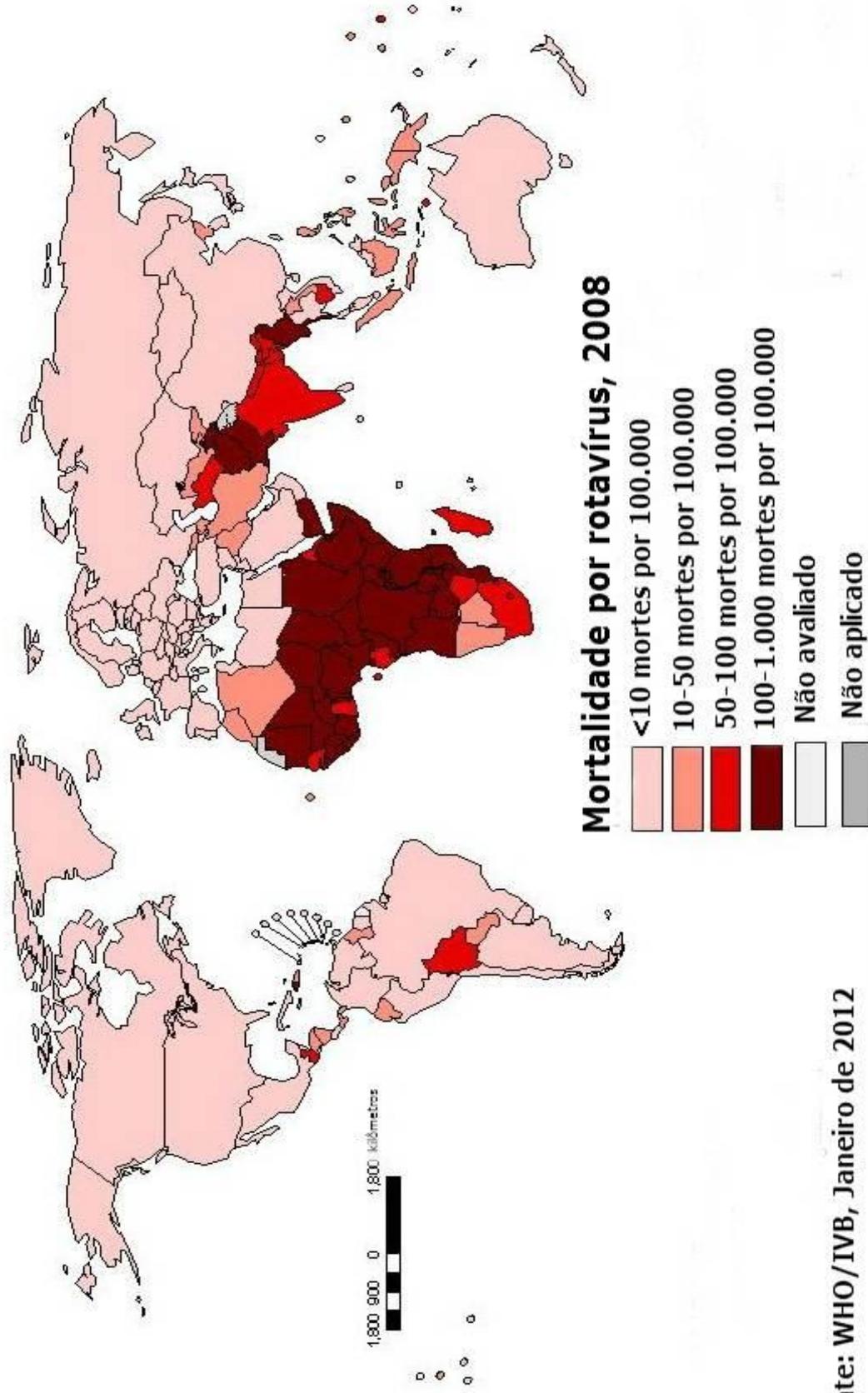
Quanto aos genótipos circulantes no Brasil atualmente, um estudo realizado de 2004 a 2011 revelou a detecção do RV em 203 (9,6%) de 2102 amostras fecais de adultos de São Paulo (SP), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Paraná(PR), Tocantins (TO), Goiás (GO), Santa Catarina (SC) e Distrito Federal (DF). A infecção por RVA foi detectada em 9,4% (197/2102), e de RV Grupo C (RVC) em 0,3% (6/2102). Os genótipos mais frequentes detectados em 2004 e 2005 foram G9P[8] (38,5%; 5/13) e G1P[8] (54,5%; 6/11), respectivamente. O genótipo dominante identificado de 2006 a 2011 foi o G2P[4] (64,4%; 116/180). Durante os 8 anos de estudo, a taxa de detecção variou de 0,7% a 12,9% (Luchs *et al.*, 2013).

1.6 Prevenção e controle da infecção por rotavírus

A imunização é a intervenção com o melhor custo-benefício para reduzir a mortalidade infantil de rotavírus (De La Hoz-Restrepo *et al.*, 2013). Atualmente existem duas vacinas licenciadas mundialmente para prevenção da infecção por rotavírus: a Rotarix[®] (GlaxoSmithKline Biologicals, Bélgica) e a Rotateq[®] (Merck and Co., NJ, USA), ambas administradas nos primeiros meses de vida (Assis *et al.*, 2013).

A Rotarix[®], vacina disponível no calendário de vacinação brasileiro desde 2006, é administrada na infância pela via oral em duas doses. É uma vacina de vírus atenuado, monovalente - contra o sorotipo G1P[8]. Antes da introdução da vacina no Brasil, o rotavírus do grupo A estava associado com 3,5 milhões de episódios de gastroenterite aguda, 650.000 consultas laboratoriais, 92.000 hospitalizações, e 850 mortes em crianças menores de cinco anos de idade, com uma prevalência variando de 20,7% a 30,9% (Assis *et al.*, 2013).

Até janeiro de 2014, a vacinação de rotavírus já tinha sido incorporada em 53 países nas Américas, Europa, África, Oriente Médio, Ásia e Oceania (PATH, 2014). O mapa mundial com os países que introduziram a vacina de rotavírus até 14 de janeiro de 2014 pode ser observado na Figura 4.



Fonte: WHO/IVB, Janeiro de 2012

Figura 3: Taxa de mortalidade de rotavírus em crianças menores que cinco anos (Tate *et al.*, 2012).

Em um ensaio clínico realizado na América Latina, a vacina Rotarix[®] mostrou uma eficácia de proteção de 85% contra diarreia grave por rotavírus. Essa vacina também se mostrou eficaz contra diarreia grave causada por G2P[4] em crianças de 6-12 meses, mas sua eficácia caiu em crianças ≥ 12 meses, o que sugere uma perda da imunidade. Também foi analisado através da comparação do triênio pré-vacinação 2002-2005 contra rotavírus com o triênio pós-vacinação 2007-2009, a taxa de mortalidade devido à diarreia e a frequência de internações foram de 22% e 17%, respectivamente. (Correia *et al.*, 2010; Do Carmo *et al.*, 2011).

A vacina Rotateq[®] é uma vacina pentavalente, de vírus atenuado, também administrada pela via oral, porém no esquema de 3 doses, contra os sorotipos G1, G2, G3, G4 e P1A[8]. Segundo um modelo matemático proposto para alguns estados brasileiros, Goiânia, Porto Alegre, Salvador e São Paulo, a eficácia da vacina varia de 93% nessas regiões, resultando numa diminuição anual de 42.991-77.383 casos de hospitalização (El Khoury *et al.*, 2011).

Introdução da vacina de rotavírus em 53 países*

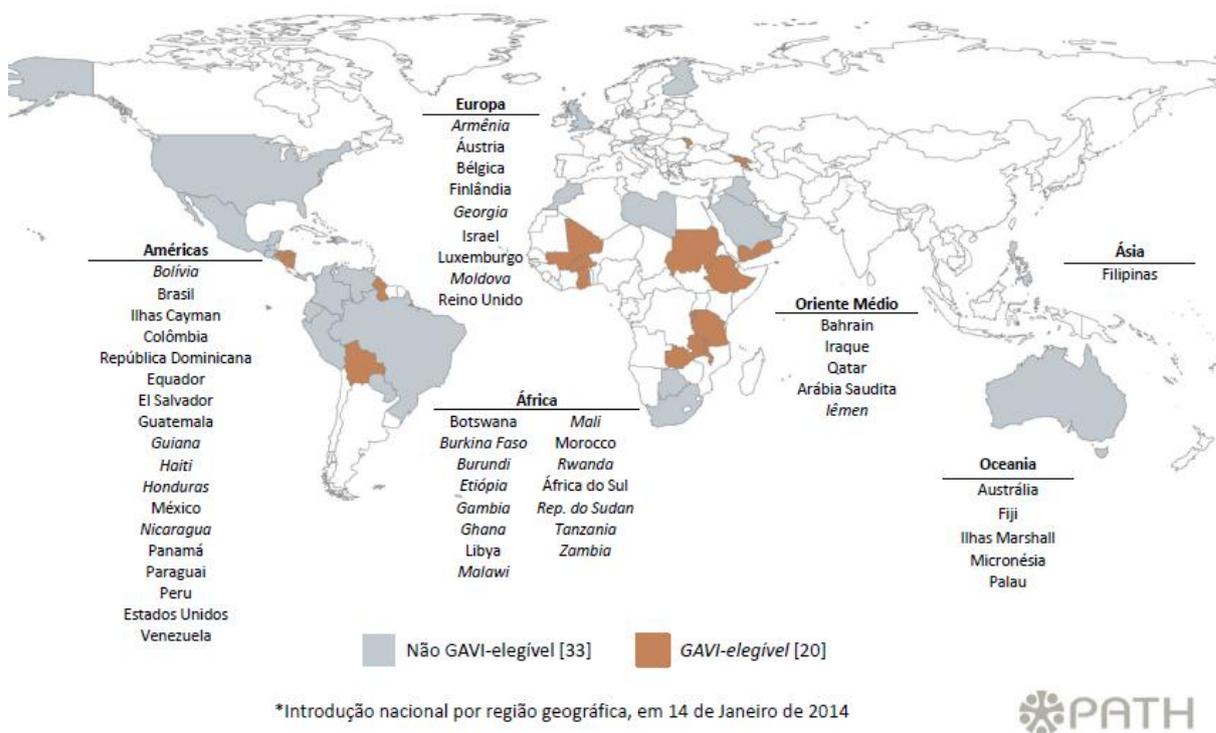


Figura 4: Países com programas nacionais de imunização contra rotavírus (PATH, 2014).

Em uma meta-análise relatando estudos feitos entre 1990-2009, foi avaliado o impacto da doença por rotavírus e os genótipos circulantes na América Latina e Caribe. Foi observada uma proporção de gastroenterite aguda causada por rotavírus de 24,3% e uma taxa de incidência de 170 casos por 1.000 crianças/ano. Do Brasil, foram incluídos 49 estudos, totalizando 44.081 pacientes, e relatando uma proporção média de 20,3% de gastroenterite causada por rotavírus. A taxa de mortalidade nos países da América Latina e Caribe foi estimada sendo de 47.000 mortes em crianças menores de 5 anos de idade por ano. O tipo de G mais comum encontrado nessa revisão foi G1 (34,2%), seguido por G9 (14,6%) e G2 (14,4%). O tipo P mais comum foi P[8] (56,2%), P[4] (22,1%) e P[1] (5,4%). As associações mais predominantes de G-P foram G1P[8] (17,9%), G2P[4] (9,1%) e G9P[8] (8,8%). Nos últimos 10 anos, a circulação de G9 aumentou consideravelmente e a de G5 quase desapareceu. E mais recentemente, G12 apareceu e G2P[4] ressurgiu (Linhares *et al.*, 2011).

Além da imunização, existem outras medidas de prevenção e controle que devem ser aplicadas em complemento não só para a prevenção da infecção por rotavírus, mas também de outras enfermidades, como infecções gastrointestinais causadas por *Shigella* spp, *Vibrio cholerae*, e protozoários (Ciccarelli, Stolfi e Caramia, 2013).

A manutenção do aleitamento materno é fortemente recomendada e deve ser exclusiva até 6 meses de idade. A implementação de medidas de saneamento básico, com o fornecimento de água potável para ingerir e preparar alimentos e o tratamento adequado do esgoto produzido são medidas de grande importância. É extremamente necessário educar a população para lavar as mãos adequadamente após o uso do vaso sanitário e antes de manipular alimentos (Ciccarelli, Stolfi e Caramia, 2013).

Devido ao fato da desidratação ser a principal causa de complicações na infecção por rotavírus, o fornecimento de fluido para reposição hidroeletrólítica é uma medida eficaz e segura para a reidratação. Existem disponíveis comercialmente probióticos que restabelecem o equilíbrio microbiano intestinal, reduzindo a duração e gravidade da gastroenterite aguda, sendo que a Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição e a Sociedade Europeia de Doenças Infecciosas Pediátricas recomenda o uso de probióticos que tenham sua

eficácia comprovada, como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri*, e *Saccharomyces boulardii*. Novas drogas como antieméticos, agentes antidiarreicos já foram propostas, mas não são aceitas universalmente (Cicarelli, Stolfi e Caramia, 2013).

1.7 Diagnóstico laboratorial da infecção por rotavírus

O diagnóstico laboratorial de rotavírus é determinado pela detecção do antígeno de rotavírus nas fezes. Por causar uma diarreia aguda, a coleta do material clínico deve ser feita no pico da diarreia, aos 2 a 4 dias de início dos sintomas, período ideal para detecção do rotavírus, pois é quando são eliminadas cerca de 10^{10} partículas virais de vírus por grama de fezes (Desselberger, 1999).

Os métodos de detecção do rotavírus incluem testes imunoenzimáticos, eletroforese em gel de poliacrilamida e reação em cadeia da polimerase. Testes imunocromatográficos e de aglutinação em látex também estão disponíveis (Gentsch, Gray, Iturriza-Gómara, Klena e Kirkwood, 2009; Paho, 2010).

1.7.1 Testes imunoenzimáticos

O princípio dos testes imunoenzimáticos se baseia na detecção de um antígeno (método direto) ou de um anticorpo (método indireto) específico. O teste padrão para diagnóstico de gastroenterite por rotavírus se baseia na detecção do antígeno viral nas fezes por ensaio imunoenzimático (EIA) – método direto. Essa reação antígeno-anticorpo pode então ser visualizada utilizando anticorpos conjugados a enzimas, que ao reagirem com seu substrato específico, produzem uma reação colorimétrica visível. (Adlhoch *et al.*, 2011).

No Brasil, em 1984, um EIA utilizando anticorpos policlonais para detecção de rotavírus e adenovírus foi desenvolvido na Fundação Oswaldo Cruz em parceria com Bio-Manguinhos, o que culminou na comercialização do EIARA. Ao comparar esse método de diagnóstico com outro EIA (WHO ELISA test), com a imunomicroscopia eletrônica e a eletroforese em gel de poliacrilamida, foi possível observar que o kit EIARA é um método sensível e específico para detecção de rotavírus e adenovírus em fezes de crianças com gastroenterite (Pereira *et al.*, 1985).

Porém, o único ensaio imunoenzimático (EIA) para detecção de rotavírus aprovado para uso pelo *Food and Drug Administration* (FDA) é o Premier™ Rotaclone® (Meridian Bioscience, EUA), que utiliza de anticorpos monoclonais contra a proteína VP6 do rotavírus. Ao utilizar o RT-PCR como padrão ouro, o desempenho do Premier™ Rotaclone® foi de: sensibilidade de 76,8%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo (VPP) de 100% e valor preditivo negativo (VPN) de 80,6% (Zeng *et al.*, 2008; Gautam *et al.*, 2013).

1.7.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Os rotavírus possuem uma classificação eletroferotípica que se baseia na diferença da taxa de migração dos onze segmentos do genoma de RNA por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), um método de diagnóstico que permite diferenciar isolados virais. Assim, o rotavírus do grupo A possui um padrão de migração que pode ser classificado em 2 subgrupos, sendo: I – padrão de migração “curto” (com uma redução marcante na taxa de migração dos segmentos), ou II – padrão de migração “longo” (com uma taxa de migração mais acentuada). Esse método de diagnóstico é realizado extraíndo o RNA viral das amostras fecais, analisando-o em gel de poliacrilamida 7,5% e sua coloração feita por nitrato de prata, o que permite detectar pequenas quantidades do ácido ribonucleico (Trabelsi *et al.*, 2010; Chouikha *et al.*, 2011; Dash *et al.*, 2012).

Embora a análise do padrão eletroferotípico por RNA-PAGE seja simples, fácil e de baixo custo, vários fatores e condições da corrida eletroforética foram relatados por afetar esse método de diagnóstico, como a concentração de acrilamina/bisacrilamida, o tipo de tampão de corrida, a voltagem utilizada e a pureza do RNA extraído (Trabelsi *et al.*, 2010; Chouikha *et al.*, 2011; Dash *et al.*, 2012).

Em um estudo que avaliou a detecção de rotavírus do grupo A que relaciona os perfis eletroferotípico e o genótipo de VP7/VP4 em crianças tunisianas, foi observada uma correlação entre o padrão de migração (curto ou longo) com a especificidade do genótipo de VP7 ($p = 0,018$) e VP4 ($p < 0,001$) (Trabelsi *et al.*, 2010; Chouikha *et al.*, 2011; Dash *et al.*, 2012).

1.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Várias técnicas moleculares como o RT-PCR convencional e o RT-PCR em tempo real têm sido utilizadas para a detecção de agentes causadores de gastroenterites virais e dos genótipos circulantes de rotavírus (Gentsch *et al.*, 2009)

O RT-PCR convencional é um método qualitativo que utiliza da transcrição reversa para converter o RNA do rotavírus em cDNA para então amplificar o gene de interesse. Um exemplo de metodologia utilizada é o *semi-nested multiplex* PCR, utilizado para a amplificação dos genes VP4 e VP7 (Das *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2012).

O RT-PCR em tempo real é um método quantitativo, que utiliza de sondas de oligonucleotídeos específicas marcadas com um fluoróforo para amplificar e quantificar em tempo real o gene de interesse. A praticidade do PCR em tempo real reside na eliminação de procedimentos de detecção pós-PCR, não sendo necessária a visualização em gel. No entanto, existe ainda um alto custo inicial para uso do equipamento, impactante para laboratórios de pequeno porte. Uma metodologia para amplificação do gene VP6 em tempo real é descrita (Mackay, Arden e Nitsche, 2002; Kang *et al.*, 2004).

Em um estudo que avaliou a eficácia do RT-PCR quantitativo (qRT-PCR) em comparação com o ensaio imunoenzimático (EIA), foi observado que o qRT-PCR foi capaz de detectar 28% mais casos positivos para rotavírus quando comparado com o EIA, confirmando ser um método rápido e sensível para o diagnóstico de gastroenterite aguda. O qRT-PCR também demonstrou ser mais sensível na detecção e quantificação de rotavírus quando comparado com a microscopia eletrônica, RT-PCR convencional e o *nested*-PCR (Mackay, Arden e Nitsche, 2002; Pang *et al.*, 2004; Logan, O'leary e O'sullivan, 2006; Zeng *et al.*, 2008; Pang *et al.*, 2011).

1.7.4 Testes imunocromatográficos

Em contraste com métodos clássicos de detecção de amostras virais nas fezes como microscopia eletrônica, teste imunoenzimático ou PCR, a imunocromatografia (ICG) pode ser realizada em um laboratório sem equipamentos elaborados, podendo ser aplicada em países em desenvolvimento. É um método prático, confiável, barato, e pode ser aplicado em estudos epidemiológicos para

avaliar o sucesso de programas de vacinação e para reduzir o uso desnecessário de antibióticos (Stürenburg e Junker, 2009).

Em um teste imunocromatográfico para a detecção simultânea de rotavírus e adenovírus em 238 amostras de crianças com gastroenterite aguda, comparando com resultados de PCR, a sensibilidade e especificidade da imunocromatografia foram, respectivamente, de 75% e 95% para rotavírus e 22% e 84% para adenovírus (Weitzel *et al.*, 2007).

Comparando os métodos de diagnóstico de rotavírus na imunocromatografia e no PAGE usando o EIA como padrão ouro, foi detectada uma sensibilidade de 87.7% e especificidade de 98.6% na ICG e 91.2% e 100%, respectivamente, no PAGE (Momenzadeh *et al.*, 2008).

1.7.5 Testes de aglutinação em látex

As primeiras observações da estrutura do látex foram feitas em 1947, onde partículas de tintas de látex de vários tamanhos foram observadas por microscopia eletrônica. Foi em 1954 que as primeiras partículas de látex de tamanho uniforme foram desenvolvidas por Backus e Vanderhoff, o que levou à elaboração de testes de aglutinação em látex para artrite reumatoide. Uma nova indústria foi criada para produzir e utilizar partículas de látex para fins científicos, incluindo o desenvolvimento de imunoensaios para uso em consultórios médicos e laboratórios (Plotz e Singer, 1956).

Os testes de aglutinação em látex têm sido amplamente empregados nos últimos anos em laboratórios de análises clínicas e têm a vantagem de serem executados com facilidade e rapidez na rotina e em locais de difícil acesso, podendo ser utilizados como método de triagem e também serem aplicados em estudos epidemiológicos. Suas aplicações incluem a detecção de mais de 100 doenças infecciosas diferentes, tendo como exemplos recentes: malária, doença de Lyme, síndrome respiratória aguda grave, tuberculose, hepatite C e dengue (Molina-Bolívar e Galisteo-González, 2005).

Os kits de diagnóstico que utilizam o látex são largamente utilizados na biologia e medicina para a detecção de pequenas quantidades tanto de antígenos quanto de anticorpos em amostras de fluidos. As aglutinações em látex envolvem a agregação *in vitro* de partículas microscópicas de origem polimérica, no caso, o

látex, mediada pela reação específica entre antígeno e anticorpo, onde um dos dois é imobilizado na superfície das partículas de poliestireno por duas maneiras: adsorção física ou ligação covalente (Molina-Bolívar *et al.*, 1998; Molina-Bolívar e Galisteo-González, 2005)

As propriedades da superfície dos polímeros carreadores, os diferentes tipos de anticorpos empregados, a estabilidade coloidal em altas forças iônicas devido às forças de hidratação e a ligação covalente dos anticorpos em partículas de látex funcionais são estratégias que podem melhorar o desempenho de testes de aglutinação em látex (Ortega-Vinuesa e Bastos-González, 2001).

Existe uma grande variedade de partículas de látex disponíveis comercialmente, e é importante avaliá-las no desenvolvimento de um teste de aglutinação. Os látex que empregam grupos carboxílicos à sua superfície são os mais utilizados, como o utilizado nesse trabalho, que de forma original utiliza desse tipo de polímero para acoplar a IgY por ligação covalente na superfície de poliestireno (Bastos-González *et al.*, 1995; Molina-Bolívar, Galisteo-González e Hidalgo-Alvarez, 1998a; b; Ortega-Vinuesa *et al.*, 1998; Ortega-Vinuesa e Bastos-González, 2001).

1.7.5.1 Os testes de aglutinação em látex na detecção de rotavírus

O diagnóstico precoce da infecção por rotavírus humano é importante para um tratamento eficaz do paciente e controle da infecção, principalmente em crianças menores de 5 anos de idade em países em desenvolvimento, onde os efeitos da má-nutrição e desidratação podem levar ao óbito. Assim, os testes de aglutinação em látex entram como uma medida eficaz de triagem de pacientes, podendo ser utilizados por laboratórios de análises clínicas e em hospitais (Ferreira *et al.*, 2006).

O primeiro teste de aglutinação em látex para detecção de rotavírus nas fezes foi realizado por Sanekata e colaboradores em 1981, onde o ensaio pôde detectar rotavírus humano nas fezes com alta sensibilidade e especificidade, quando comparado com hemaglutinação passiva reversa e microscopia eletrônica. A partir daí, diversos ensaios foram desenvolvidos, possibilitando o desenvolvimento de kits de diagnóstico de aglutinação em látex para detecção de rotavírus com elevada sensibilidade e especificidade (Sanekata, Yoshida e Okada, 1981; Hughes *et al.*, 1984; Pai, Shahrabadi e Ince, 1985; Brandt *et al.*, 1987; Kok e Burrell, 1989; Yap,

1994; Kohno *et al.*, 2000; Al-Yousif *et al.*, 2001; Buser *et al.*, 2001; Raboni *et al.*, 2002; De Góes *et al.*, 2008).

Os testes de aglutinação em látex disponíveis comercialmente hoje são baseados na detecção do rotavírus por anticorpos IgG, tanto policlonais quanto monoclonais, ligados à partículas de látex. No Brasil, um estudo prévio buscou testar o teste de aglutinação em látex “Slidex Rota-kit 2” (BioMérieux, França) em pacientes de 2 hospitais do Rio de Janeiro e comparar com a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Os resultados demonstraram uma concordância de 91% entre o Slidex/PAGE e 100% entre o EIARA/PAGE, com uma sensibilidade de 82,9% e especificidade de 98,1% (Ferreira *et al.*, 2006).

A substituição da IgG de mamíferos pela Imunoglobulina Y (IgY), um anticorpo presente em aves e transferida do soro para a gema do ovo por transporte ativo, surge então como um método alternativo como insumo no diagnóstico. Baseado nisso, é necessário compreender como ocorre o processo de síntese da IgY nas aves (Morrison *et al.*, 2002).

1.8 Síntese de anticorpos pelas aves

A bursa de Fabricius está presente somente nas aves e foi implicada como tendo um papel na maturação dos linfócitos e geração de respostas de anticorpos (Glick *et al.*, 1956).

As aves possuem pouca ou nenhuma diversidade nos segmentos gênicos V, D e J das linhagens germinais, e as sequências da região V rearranjadas são idênticas ou similares à maioria das sequências das células B imaturas. Assim, a diversidade de anticorpos é basicamente formada por um processo chamado conversão gênica. Nesse processo, pequenas sequências do gene da região V rearranjado e expresso são substituídas por sequências de um segmento V de um pseudogene (Janeway *et al.*, 2006; Ratcliffe, 2008).

As aves apresentam somente um tipo de cadeia leve de imunoglobulinas, em contraste com roedores e primatas que apresentam dois tipos de cadeias leves: κ e λ , e o processo de rearranjo de genes de imunoglobulinas da cadeia leve gera uma diversidade mínima (Ratcliffe, 2008).

Assim como no rearranjo da cadeia leve, o rearranjo da cadeia pesada contribui pouco para a geração de diversidade de anticorpos. A conversão gênica vai então ser o mecanismo responsável por gerar uma maior diversidade nas aves (Ratcliffe, 2008).

1.8.1 Imunoglobulina Y

A descrição da existência de anticorpos neutralizantes na gema de ovos obtidos de frangas imunizadas foi inicialmente descrito por Klemperer em 1983. Porém, foi a partir de 1992 que a extração de anticorpos específicos de ovos de aves se tornou uma alternativa atrativa à sangria de mamíferos e desde 1996, o uso da IgY como método alternativo é recomendado pelo Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (EVCAM), visando refinar, reduzir e substituir o uso de animais de laboratório (Klemperer, 1983; Schade *et al.*, 1996; Schade *et al.*, 2000).

A Imunoglobulina Y (IgY), um anticorpo presente em aves, répteis e anfíbios, é transferida do soro para a gema do ovo por transporte ativo, onde se concentra em grandes quantidades nesse local. À medida que o oócito aviário se desenvolve, receptores em sua membrana fazem o sequestro de grandes quantidades de IgY que são armazenados no interior da gema estéril. No momento da postura do ovo, até 200 mg de imunoglobulina Y estão presentes na gema. Combinando-se a capacidade da indústria de produzir milhares de ovos por dia e com uma infraestrutura para o fracionamento eficiente e purificação das proteínas da gema do ovo, é concebível que gramas de IgY possam ser produzidas diariamente (Morrison *et al.*, 2002).

O uso da IgY policlonal em substituição aos anticorpos IgG de mamíferos possui algumas vantagens, como: não há necessidade de sangria do animal, visto que só a coleta dos ovos após imunizar as aves é necessária; a purificação da IgY é rápida e simples; altos títulos de IgY são produzidos pelas aves imunizadas, e a manutenção das aves possui um maior custo-benefício quando comparada com a manutenção de mamíferos em biotério (Gottstein e Hemmeler, 1985; Kowalczyk *et al.*, 1985; Gassmann *et al.*, 1990; Hatta *et al.*, 1993; Schade e Hlinak, 1996; Morrison *et al.*, 2002).

1.8.2 Características da IgY

A IgY é secretada para o sangue e transferida para a gema do ovo, onde se acumula (Warr, Magor e Higgins, 1995).

As proteínas da gema são separadas em duas partes por centrifugação: granular e plasmática (Li *et al.*, 1998; Kovacs-Nolan, Phillips e Mine, 2005).

A parte granular é formada por 70% de lipoproteínas de alta-densidade (HDL: α - e β -lipovitelinias), 16% de fosvitina (glicofosfoproteína) e 12% de lipoproteínas de baixa-densidade (LDL). A parte plasmática é formada por 86% de LDL e 14% de livetinas, que são glicoproteínas globulares livres de lipídios, solúveis em água, e divididas em três classes: α -, β - e γ -livetinas (Bernardi e Cook, 1960; Mccully, Mok e Common, 1962). A Imunoglobulina Y é a proteína predominante da γ -livetina. (Kovacs-Nolan e Mine, 2005; Nilsson *et al.*, 2008).

A IgY é sequestrada da corrente sanguínea pelo epitélio folicular do ovário para a gema do ovo através do receptor Fc da IgY (FcRY) presente na membrana do saco vitelino. A quantidade de IgY transferida está relacionada à quantidade de IgY presente na circulação materna (West, Herr e Bjorkman, 2004; He e Bjorkman, 2011).

Além de sua presença no sangue (5-7 mg/dL) e em maior concentração na gema do ovo (100 mg/gema de ovo), também pode ser encontrada no conteúdo duodenal, secreções traqueais e fluído seminal (Leslie e Clem, 1969).

A IgY é resistente em pH de 4,0 a 9,0, sendo mais sensível que a IgG de coelho à desnaturação ácida, que tem sua atividade entre pH 3,0 e pH 4,0 (Shimizu *et al.*, 1992), porém perde sua atividade em pH menor do que 3,5 e maior do que 11 e é sensível à pepsina em baixos pH (Hatta *et al.*, 1993).

A IgY permanece estável até 40°C, perdendo sua atividade progressivamente com o aumento da temperatura. Pelo fato da IgY ser razoavelmente estável a 60°C por períodos curtos, pode ser submetida a processos de pasteurização (Shin *et al.*, 2002). O ponto isoelétrico desta imunoglobulina varia entre 5,7 e 7,6 (De Almeida *et al.*, 2008).

A IgY é composta por duas cadeias leves (L – “light”) e duas pesadas (H – “heavy”). Suas cadeias L e H possuem domínios variáveis e constantes. Porém, enquanto a cadeia L da IgY é composta por um domínio variável e um constante, a cadeia H contém um domínio variável e quatro constantes (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} e C_{H4}),

diferente da IgG de mamífero que possui três domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} e C_{H3}) (Carlander, 2002). A molécula de IgY é menos flexível do que a IgG porque não apresenta a região de dobradiça, apresentando resíduos de prolina e glicina entre os domínios C_{H1} - C_{H2} e C_{H2} - C_{H3} (Warr, Magor e Higgins, 1995) (Figura 5).

A cadeia pesada da IgY é de 70 kDa, enquanto o peso molecular da cadeia pesada da IgG de mamífero é de 50 kDa. Ambos os anticorpos possuem o mesmo peso molecular da cadeia leve: 21 kDa (Hatta *et al.*, 1993).

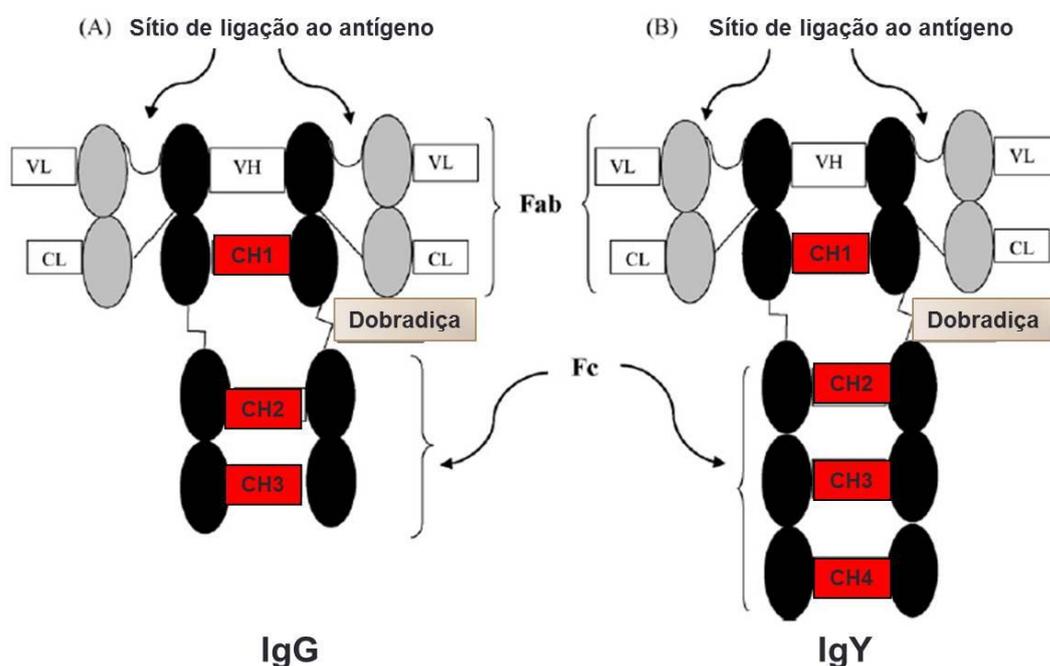


Figura 5: Comparação entre as estruturas moleculares da IgG de coelho (A) e da IgY de ave (B) (Schade *et al.*, 2005).

1.8.3 Produção de anticorpos IgY específicos

Para obter anticorpos IgY específicos para o antígeno de interesse, as aves poedeiras devem ser imunizadas com o antígeno alvo. A resposta imunológica ao antígeno tende a variar de acordo com o tipo de adjuvante usado na imunização e a via de administração (Schade *et al.*, 1994).

A fração de anticorpos IgY específicos ao antígeno de interesse representa de 2 a 10% da IgY total obtida. Assim, se de cada gema são obtidos 200 mg de IgY, 20 mg correspondem à IgY de interesse (Schade *et al.*, 1994).

Uma variedade de antígenos podem ser utilizados para produzir uma IgY específica, como por exemplo: proteínas, bactérias, vírus, parasitas, fungos, polipeptídeos, hormônios, toxinas, entre outros (Schade *et al.*, 2005).

O adjuvante incompleto de Freund (IFA), uma emulsão de óleo-água e componentes de micobactérias, é atualmente o mais utilizado para produção de imunoglobulinas específicas, estabelecendo um depósito de antígeno, liberando-o lentamente; funcionando como um veículo de transporte do antígeno por todo o sistema linfático até o linfonodo regional e interagindo com as células apresentadoras de antígenos, incluindo fagócitos, macrófagos e células dendríticas (Stills, 2005; Lévesque, Martinez e Fairbrother, 2007; Chalghoumi, Beckers, *et al.*, 2009).

Outro exemplo de adjuvante utilizado, abrange o uso de oligodesoxinucleotídeos, uma molécula de DNA sintética que contém uma citosina ligada a uma guanina pelo grupamento fosfato, a C-fosfato-guanosina (CpG-ODN) (Klinman, Barnhart e Conover, 1999; Hemmi *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2004; Hemmi e Akira, 2005). O CpG-ODN é um agonista sintético de receptores *Toll-like* 9 e indutor potente da imunidade inata e adquirida (Vincent *et al.*, 2009) contra bactérias, vírus, fungos e parasitas (Davis *et al.*, 1998; Moldoveanu *et al.*, 1998; Eastcott *et al.*, 2001; Mahmood *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009).

A via mais comum para administração do antígeno em aves é a via intramuscular, normalmente no músculo peitoral (Schade *et al.*, 2005). Outra forma de inoculação seria pela via subcutânea na região cervical, mas não é muito recomendada por ser de difícil aplicação e pelo sofrimento conferido ao animal, principalmente aos mais jovens (Schade e Hlinak, 1996). Além disso, foi comprovado que a imunização pela via intramuscular resulta no aumento da quantidade de anticorpos específicos quando comparada com a imunização subcutânea (Chang *et al.*, 1999).

Existem várias formas de purificar a IgY da gema do ovo, como por exemplo: por sal, sulfato de dextrano, diluição xantana, goma, etanol, precipitação por polietileno glicol (PEG), cromatografia tiofílica, diluição em água, entre outros e a pureza e o rendimento varia muito entre estes métodos. Um estudo relatou uma pureza da IgY de 92% após purificação através do método de diluição por água (Akita e Nakai, 1992; Akita e Nakai, 1993; Hansen *et al.*, 1998) (Gee *et al.*, 2003).

A precipitação da gema do ovo por polietileno glicol, acidificação e o método de diluição por água são os mais comuns (Larsson e Sjöquist, 1990; Akita e Nakai, 1993; Svendsen *et al.*, 1995; Dávalos-Pantoja *et al.*, 2000). A IgY isolada tinha elevado grau de pureza confirmado pelo SDS-PAGE e apresentou boa atividade biológica como confirmado por *Western Blotting* (Fu *et al.*, 2006). Altos níveis de concentração obtidos a partir da purificação de uma IgY específica para o vírus da hepatite A (IgY anti-HAV) por PEG sugere que a gema de ovo pode ser uma fonte em larga escala de obtenção de anticorpos específicos contra esse vírus (De Paula *et al.*, 2011).

1.8.4 Aplicação da IgY em diagnóstico e tratamento

Os dois trabalhos presentes na literatura que apresentam uma aplicabilidade da IgY em testes de aglutinação em látex propõe a adsorção passiva da IgY ao látex e sua comparação quanto às propriedades físico-químicas e estabilidade coloidal frente à adsorção passiva utilizando a IgG. A partir desses estudos, foi possível observar que as partículas de aglutinação em látex conjugadas à IgY não agregam com o fator reumatoide, fato que acontece quando a reação é realizada com a IgG de mamíferos. Diferentes experimentos comprovaram que a IgY é mais hidrofóbica quando comparada com a IgG, além de que a IgY possui uma estabilidade coloidal maior do que a IgG em pH 8.0 (Dávalos-Pantoja *et al.*, 2000; 2001).

Um ensaio imunoenzimático competitivo foi desenvolvido para medir os níveis totais de anticorpos anti-HAV usando uma IgY anti-HAV tanto como anticorpo de captura quanto imunoglobulina conjugada. Esse método de diagnóstico demonstrou uma sensibilidade de 95% e especificidade de 98,8% (Silva *et al.*, 2012).

A IgY tem sido usada com sucesso em ensaios imunoenzimáticos para detecção de *Schistosoma japonicum* (Lei *et al.*, 2009), vírus da febre aftosa (Veerasami *et al.*, 2008) e vírus Sendai em suínos (Kvietkauskaitė e Acaite, 2004).

Por ser resistente à barreira gastrointestinal, a IgY tem sido utilizada em várias pesquisas onde se realizaram terapias de imunização passiva por ingestão oral de IgY em alimentos fortificados e gema de ovo purificada para prevenção e tratamento de infecções intestinais, como aquelas causadas pelo coronavírus bovino, *Yersinia ruckeri*, *Escherichia coli*, *Edwardsiella tarda*, *Staphylococcus sp.*,

Pseudomonas sp. e *Helicobacter pylori* Urease B, *Salmonella enterica* Typhi e rotavírus (Shin *et al.*, 2002; Tini *et al.*, 2002; Sarker *et al.*, 2007).

O uso da IgY em humanos contra *Streptococcus mutans* diminuiu cáries quando rinsado na boca (Hatta *et al.*, 1997). A IgY teve bons resultados na prevenção de infecções bacterianas, pois os anticorpos protegem contra adesão das bactérias às células do intestino (Sugita-Konishi *et al.*, 2000; Girard *et al.*, 2006; Chalghoumi, Théwis, *et al.*, 2009) e previnem a invasão das células epiteliais (Sugita-Konishi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002).

A administração oral de IgY específica pode prevenir a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (Kollberg *et al.*, 2003). Deste modo, a IgY é uma alternativa aos antibióticos para tratamento de patógenos entéricos resistentes a antibióticos em humanos e animais (Carlander *et al.*, 2000).

O uso da IgY experimentalmente em imunoterapia para tratamento da diarreia causada por rotavírus vem crescendo ao longo dos anos. Um exemplo foi o ensaio clínico utilizando uma IgY anti-RV produzida a partir de aves imunizadas para tratamento de crianças de 4 a 24 meses com diarreia severa causada por rotavírus, administrada por via oral (Sarker *et al.*, 2001).

Um segundo trabalho relata a infecção experimental de bezerros recém-nascidos com rotavírus bovino, onde a IgY anti-RV bovina foi administrada por via oral para tratamento passivo. Apesar de existir uma vacina contra rotavírus bovino disponível comercialmente, que é administrada em bovinos durante o período de gestação, o que resultaria em uma proteção dos bezerros através da transferência materna de anticorpos, essa estratégia reduz a diarreia grave, mas não previne a infecção ou o aparecimento de sintomas clínicos. O suplemento do leite com anticorpos específicos derivados da gema do ovo em bezerros recém-nascidos conseguiu diminuir o título viral de rotavírus nas fezes e também o número de bezerros liberando vírus. Assim, a administração de anticorpos IgY específicos pode representar uma estratégia para prevenção de infecções gastrointestinais em animais de abate (Vega *et al.*, 2011).

Outro trabalho do mesmo grupo buscou tratar leitões gnotobióticos infectados experimentalmente com o rotavírus humano Wa G1P[8] usando uma IgY anti-RV administrada por via oral. Apesar de já existirem vacinas para rotavírus, a sua eficácia é menor em países em desenvolvimento e, além disso, já foi comprovado o registro de

crianças com imunodeficiência combinada severa que tiveram infecção por rotavírus A adquirida pela vacina, assim como casos de intussuscepção pós-vacinal. Nesse contexto, a administração da IgY presente na gema de ovo derivada de galinhas hiperimunizadas contra o rotavírus representa uma estratégia economicamente viável e prática, que tem sido explorada para o tratamento passivo da infecção por RVA (Vega *et al.*, 2012).

1.9 Justificativa

O rotavírus é o principal causador de gastroenterite aguda em crianças menores de cinco anos de idade, sendo o grupo A o de maior importância epidemiológica (Bicer *et al.*, 2011). O diagnóstico de quadros de infecção por rotavírus é de extrema importância para determinar surtos de rotavírus para campanhas de prevenção e para impedir o uso indiscriminado de antibióticos. Neste contexto, o teste de aglutinação em látex para detecção de rotavírus nas fezes tem sido utilizado por apresentar boa sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo, e devido à sua simplicidade, rapidez e baixo custo, tem sido adequado para o diagnóstico da infecção por rotavírus, podendo ser utilizado na triagem de pacientes e em trabalhos de campo em locais de difícil acesso (Ferreira *et al.*, 2006).

Os imunoenaios comerciais disponíveis para detecção de antígeno normalmente utilizam a imunoglobulina G (IgG) ligada ao látex. Porém, Dávalos-Pantoja e colaboradores descreveram em 2001 que o uso da IgY complexada ao látex apresenta estabilidade coloidal maior do que a IgG, fazendo da IgY um anticorpo interessante a ser aplicado na detecção de antígenos em testes de aglutinação em látex.

A produção de anticorpos de uma forma econômica, rápida e que ao mesmo tempo seja específica para o antígeno de interesse é cada vez mais necessária para ser aplicada em testes de diagnósticos. Historicamente, a produção de anticorpos policlonais envolve a sangria de animais de laboratório para purificação de anticorpos. A IgY é um anticorpo presente em grande concentração em aves, anfíbios e répteis e sua utilização em imunoenaios surge como uma alternativa ao método clássico de obtenção de anticorpos, pois utiliza uma metodologia não invasiva, através da purificação da imunoglobulina a partir da gema do ovo de

frangas imunizadas (Schade *et al.*, 2005). Outras vantagens do uso da IgY incluem a facilidade e rapidez de purificação dessa imunoglobulina, encontrada em grande quantidade na gema do ovo, assim como a ausência de reações cruzadas com epítomos de mamíferos, o que evita a interferência em testes imunológicos (Spillner *et al.*, 2012).

Portanto, neste trabalho visamos detectar o antígeno de rotavírus A em amostras fecais oriundas do Centro de Referência Regional para Rotavirose do LVCA/IOC-FIOCRUZ, utilizando uma IgY anti-Rotavírus A conjugada ao látex.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer a detecção de antígenos do rotavírus grupo A nas fezes através de um teste de aglutinação em látex adaptado para a utilização de anticorpos IgY anti-rotavírus do grupo A como captura do antígeno viral.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir IgY anti-RVA através da imunização de aves poedeiras para a utilização em um teste de aglutinação em látex;
- Determinar a especificidade da IgY anti-RVA produzida por Western Blotting
- Realizar a conjugação da IgY anti-RVA à partículas de poliestireno para utilização em um teste de aglutinação em látex;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade do teste de aglutinação em látex utilizando anticorpos IgY anti-RVA utilizando amostras fecais positivas e negativas para RVA;
- Comparar o teste de aglutinação em látex utilizando a IgY anti-RVA com o Diagnóstico de Referência e com dois imunoenaios comercialmente disponíveis de aglutinação em látex utilizando a IgG.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto é produto de colaboração entre o Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia/IOC-FIOCRUZ, Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental/IOC-FIOCRUZ, e Laboratório de Imunologia Aplicada/FUNED/MG e UFMG.

3.1 Produção e purificação de rotavírus em cultura de células

A produção do RVA Wa humano foi realizada utilizando a linhagem de cultura de células MA-104, derivada de células de rim fetal de macaco Rhesus, cedida pelo LVCA, em meio Eagle Hanks sem soro fetal bovino (SFB) com 0,5 µg/mL de tripsina, observando por 7 dias a formação de efeito citopático. Primeiramente, 3 mL de RVA foi incubado com 3mL de tripsina (20 µg/mL) a 37°C por 30 minutos na proporção 1:1. Depois, 750 µL do inóculo com a tripsina foi incubado com a linhagem MA-104 por 1 hora a 37°C, o inóculo foi descartado da garrafa de cultura, foi realizada a lavagem com PBS 1X pH 7,4 e foi adicionado 30 mL de meio Eagle Hanks sem SFB com 0,5 µg/mL de tripsina à garrafa de cultura, por 7 dias, até formar o efeito citopático. A cultura foi congelada e descongelada por três vezes para que ocorresse a lise celular e liberação do vírus. A purificação do rotavírus foi realizada em colaboração com o LVCA por uma metodologia já estabelecida pelo laboratório (Beards, 1982). Sucessivas centrifugações foram realizadas com todo o volume produzido de cultura de células com RVA (750 mL) a 30.000 rpm por 1 hora a 4°C, descartando o sobrenadante e armazenando o *pellet*, e por fim ressuspensando o *pellet* em 2 mL de solução de Tris/Cálcio (100mM Tris; 1,5mM CaCl₂; pH7,2). O vírus foi posteriormente centrifugado a 3.000 rpm por 30 minutos com 6mL de Freon[®] e pérolas de vidro para desfazer o *pellet*, e a fase aquosa superior da centrifugação foi coletada e separada com um gradiente de 1mL de sacarose 45% a 45.000 rpm por 1 hora a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em Tris/Cálcio (100mM Tris; 1,5mM CaCl₂; pH7,2). O rotavírus foi centrifugado por gradiente de cloreto de cézio (500 mg/mL) a 45.000 rpm por 16 a 18 horas a 4°C. Foi observado um anel formado pelo rotavírus devido ao gradiente obtido por cloreto de cézio (CsCl), com densidade de 1,375 (Espejo, López e Arias, 1981; Zárate *et al.*, 2000).

Para remoção da toxicidade, foi feita uma diálise com a solução de Tris/Cálcio (100mM Tris; 1,5mM CaCl₂; pH7,2) para retirá-lo. O rotavírus purificado foi então utilizado para imunizar frangas poedeiras, a fim de se obter uma Imunoglobulina Y específica para o rotavírus (IgY anti-RVA).

3.2 Imunização das aves

Nove frangas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) da raça Rhodia (Figura 6) foram mantidas no Laboratório de Bioclimatologia na Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Serra dos Órgãos (UNIFESO), em Teresópolis e divididas em três grupos: o grupo I recebeu três imunizações com intervalos de um mês com uma suspensão de 50 µL de RVA humano (isolado Wa - 4x10⁵ cópias de RNA/mL) associado com 80 µL do adjuvante incompleto de Freund (IFA) e 20 µL do adjuvante CPG-ODN (BioCorp, Canadá). O grupo II recebeu a primeira imunização somente com 80 µL de IFA e 20 µL de CPG-ODN associado com 50 µL de tampão Tris/Cálcio e na segunda e terceira imunizações, recebeu uma suspensão de 50 µL de RVA humano (isolado Wa), associado à mistura de 80 µL de IFA e 20 µL de CPG-ODN. O grupo III (grupo controle) recebeu três imunizações com intervalos de um mês somente com 80 µL de IFA e 20 µL de CPG-ODN associado com 50 µL de tampão Tris/Cálcio (Tabela 1). Todas as aves foram imunizadas via intramuscular no músculo peitoral. A primeira imunização foi aos 38 dias de vida das aves, a segunda aos 74 e a terceira aos 103 dias. Após o início da postura dos ovos, estes foram coletados por 13 semanas, totalizando 477 ovos. Após 230 dias de coleta, as aves foram eutanasiadas com barbitúricos. O experimento com as aves foi aprovado pelo Comitê de Ética no Trato com Animais (CETA) da UNIFESO, sob o número de licença 0331/11.

Tabela 1: Estratégia de imunização de frangas poedeiras com RVA e grupo controle.

Grupo	Inóculo	Número de animais	Doses com imunógeno
I	RVA + IFA + CpG-ODN	3	3
II	RVA + IFA + CpG-ODN	3	2
III	IFA + CpG-ODN	3	0

RVA: Rotavírus do grupo A; CpG-ODN: Sequência nucleotídica; IFA: (Adjuvante Incompleto de Freund).

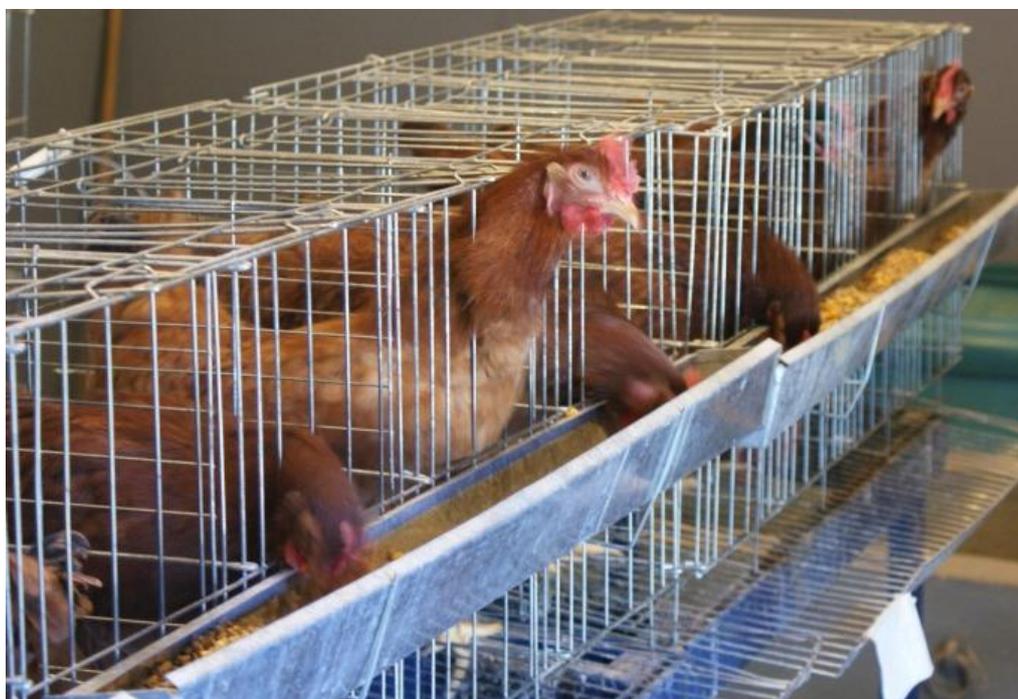


Figura 6: População de frangas poedeiras mantidas individualmente no Laboratório de Bioclimatologia na Faculdade de Medicina Veterinária do Centro Universitário da Serra dos Órgãos (UNIFESO) para imunização com RVA.

3.3 Purificação da IgY por polietilenoglicol (PEG)

Para a obtenção da imunoglobulina Y anti-Rotavírus A (IgY anti-RVA), os ovos das frangas inoculadas foram coletados por 13 semanas e separados em *pools* a cada semana. A IgY foi purificada da gema do ovo pelo método de precipitação por polietileno glicol (PEG) proposto por Polson e colaboradores (1985). A purificação por polietileno glicol já foi estabelecida e publicada pelo LADTV, e

envolveu a produção de anticorpos IgY contra o HAV (De Paula *et al.*, 2011). Inicialmente, a 10 mL de gema de ovo foram adicionados 40 mL de PBS (pH 7,4) e PEG 6.000 à 3,5% (p/v). A mistura foi então homogeneizada e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e centrifugada por 25 minutos (5.000 g) a 25°C. Após a centrifugação, a solução se divide em três fases. A fase contendo lipídeos (sobrenadante) e IgY (fase intermediária) foram decantadas por um funil com papel de filtro e a fase semi-sólida (precipitada), composta de outras proteínas que não a IgY, foi descartada. À solução filtrada foi adicionado PEG 6.000 à 12% (p/v). A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos; depois, foi centrifugada (5.000 g) por 25 minutos a 25°C. O sobrenadante (lipídeos) foi descartado e o precipitado (IgY) foi dissolvido em 25 mL de PBS (pH 7,4), com adição de PEG 6.000 à 12% (p/v). A mistura foi homogeneizada e incubada por 10 minutos. Posteriormente, repetiu-se a centrifugação (5.000 g) por 25 minutos a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em 2,5 mL de etanol gelado à 50% e 2,5 mL de PBS (pH 7,4), para retirar o PEG residual. A solução foi centrifugada (10.000 g) por 25 minutos a -5°C, descartando o sobrenadante ao final (PEG residual). Para finalizar a purificação, o precipitado foi ressuspensão em 2,5 mL de PBS (pH 7,4).

3.4 Quantificação da IgY

Para a quantificação da IgY purificada foi utilizado o kit de dosagem de proteínas pelo Ácido Bicinconínico (BCA) (Sigma-Aldrich, USA). As amostras e a curva padrão foram incubadas a 37°C por 30 minutos e foi realizada a leitura no espectrofotômetro GeneQuant PRO (GE Healthcare, USA) a 562 nm. A concentração da IgY foi calculada comparando a absorvância encontrada com a absorvância dos pontos da curva padrão de concentrações conhecidas.

3.5 Caracterização da IgY por SDS-PAGE

A caracterização da IgY purificada por PEG foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% (De Paula *et al.*, 2011). A eletroforese foi feita em uma cuba de mini gel (Bio-Rad Laboratories, EUA), com um padrão de peso molecular *Protein Markers* (Promega, EUA). A IgY anti-RVA purificada foi diluída em tampão de amostra (0,005% de *Azul de Coomassie*; 0,25% de glicerol, 0,05% de β -mercaptoetanol) para se obter a banda de IgY com melhor visualização no gel. A IgY foi desnaturada por 5 minutos à 95°C. Após a desnaturação, a amostra foi corrida no gel a 120V, em Tampão Tris-glicina 1X (Glicina 192 mM; SDS 4 mM e Tris-Base 25 mM) por aproximadamente uma hora e meia. O gel foi corado com *Azul de Coomassie* 0,1% para visualização da IgY purificada.

3.6 Determinação da especificidade da IgY ao rotavírus por Western Blotting

A especificidade da IgY anti-RVA purificada por PEG ao rotavírus foi determinada por *Western Blotting*. Primeiramente, o RVA foi desnaturado por 5 minutos a 95°C e foi feita a sua eletroforese em gel de poliacrilamida 12% a 120 V por uma hora e meia (De Paula *et al.*, 2011). O gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose de 0,22 μ M a 100V por 4 horas. Posteriormente, a membrana foi bloqueada com uma solução tampão fosfato com Tween-20 à 0,05% (PBST) com 5% de leite, *overnight* a 25°C sob agitação. A membrana foi cortada em tiras iguais e incubada com 10 mL da IgY RVA à 0,5 mg/mL purificada por PEG 6.000 referente à semana 11 com 5% de leite por uma hora e meia a 37°C sob agitação. A membrana foi incubada com 10 mL de IgG de coelho anti-IgY conjugada à peroxidase (Sigma, EUA) diluída 1:2.000 por uma hora a 37°C sob agitação. A membrana foi lavada três vezes com PBST à 0,05%. As bandas foram reveladas utilizando 5 mg de 3,3'- diaminobenzidina tetrahidroclorato (DAB) em 20 microlitros de peróxido de hidrogênio 30 volumes (H_2O_2) e 100 microlitros de cloreto de cobalto ($CoCl_2$) no volume final de 10 mL de PBS (pH 7,4). A reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.7 Purificação adicional da IgY anti-RVA por cromatografia de troca iônica

Com o objetivo de obter uma IgY com menos interferentes para ser aplicado no teste de aglutinação em látex, a IgY anti-RVA foi submetida à uma purificação adicional por cromatografia de troca iônica, utilizando uma coluna empacotada com uma matriz de agarose, a Sepharose CL-6B (GE Healthcare, EUA). A IgY foi purificada a partir de um *pool* de amostras das semanas de 1 a 13, dos Grupos I e II. Essa purificação foi aprimorada em colaboração com a Fundação Estadual Ezequiel Dias (FUNED), Minas Gerais, Laboratório de Imunologia Aplicada. Primeiramente, a IgY foi dialisada em tampão fosfato de sódio 20mM por 24 horas, com três trocas de tampão nesse período. A resina de Sepharose foi então empacotada em uma coluna de 0,8 cm de raio e que pós o empacotamento apresentava 2,1 cm de altura. Foi estabelecido um fluxo contínuo da coluna de 2 mL/min, utilizando a bomba peristáltica Pharmacia LKB-P-1 Pump (Pharmacia LKB Biotechnology, Suécia). A coluna foi inicialmente lavada com 12 mL de NaCl 1M. A coluna foi equilibrada com 12 mL do tampão fosfato de sódio 20 mM pH 8,0, o mesmo tampão em que foi dialisada a IgY. Foi então aplicada na coluna 20 mg da IgY, recolhendo o volume dispensado em frações de 1 mL. Para eluir a IgY, foi utilizado tampão fosfato de sódio 0,2M pH 8,0.

A concentração de proteínas em mg/mL dispensada pela coluna foi mensurada por espectrofotometria a 280 nm e calculada de acordo com a Lei de Lambert-Beer utilizando o coeficiente de extinção de 1,33 para IgY (Leslie e Clem, 1969). Assim, o cálculo da concentração da IgY foi definido como:

$$[\text{IgY}] = \frac{\text{Absorbância (280 nm)} \times \text{fator de diluição}}{1,33 \text{ (coeficiente de extinção)}}$$

A IgY purificada por troca iônica foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) 12% (De Paula *et al.*, 2011). A eletroforese foi feita em uma cuba de mini gel (Bio-Rad Laboratories, EUA), com um padrão de peso molecular *Bluestep protein* (Amresco, EUA). A IgY anti-RVA purificada foi diluída em tampão de amostra (0,005% de *Azul de Coomassie*; 0,25% de glicerol, 0,05% de β -mercaptoetanol) para se obter a banda de IgY com melhor visualização no gel. A IgY foi desnaturada por 5 minutos à 95°C. Após a

desnaturação, a amostra foi corrida no gel a 120V, em Tampão Tris-glicina 1X (Glicina 192 mM; SDS 4 mM e Tris-Base 25 mM) por aproximadamente uma hora e meia. O gel foi corado com *Azul de Coomassie* 0,1% para visualização da IgY purificada.

Após a coleta, foi feito um *pool* das frações e a IgY foi dialisada em PBS 1x pH 7,4 por 24 horas, com três trocas de tampão nesse período.

Após o aprendizado da técnica na FUNED, essa tecnologia de purificação adicional por cromatografia de troca iônica foi incorporada no Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia/IOC-FIOCRUZ

3.8 Conjugação da IgY anti-RVA à partículas de poliestireno

A ligação da IgY ao látex também foi realizada em colaboração com o Laboratório de Imunologia Aplicada da Fundação Estadual Ezequiel Dias (FUNED), no. A IgY foi ligada covalentemente ao carboxil-látex 4% (% w/v), 3 μ M (Sigma, USA) utilizando o cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) (Sigma, EUA) (Figura 7). Primeiramente, foi diluído 4,1 g do carboxil-látex em 1,0 mL de PBS 1x pH 7,4, obtendo uma concentração das partículas de poliestireno de 1%. Posteriormente, essa solução foi diluída em 10,0 mL de PBS, homogeneizando e centrifugando a 10.000 g por 15 minutos a 4°C, descartando o sobrenadante lentamente. Repetiu-se essa etapa e depois as esferas foram ressuspensas em 5,0 mL de PBS 1x pH 7,4. Adicionou-se 2,0 mL da solução de EDC (50 mg/mL), gotejando em agitação lentamente e incubando por 20 minutos sob agitação constante. Posteriormente, as esferas foram lavadas com PBS 1x pH 7,4 e centrifugadas a 10.000 g por 5 minutos a 4°C. Por fim, foi adicionado 10 mg de IgY anti-RVA purificada em 1,0 mL do carboxi-látex, e a suspensão foi incubada por 3 horas sob agitação constante a temperatura ambiente. Para finalizar, essa reação foi lavada com PBS 1x pH 7,4, centrifugando 2 vezes a 10.000 g por 15 minutos a 4°C. Para bloqueio, foram adicionados 10 mL de etanolamina 1M pH 8,0 (Sigma, EUA), e, após a incubação *overnight*, foram realizadas três lavagens com PBS 1x pH 7,4 a 10.000 g por 15 minutos a 4°C (Bastos-Gonzáles *et al.*, 1995).

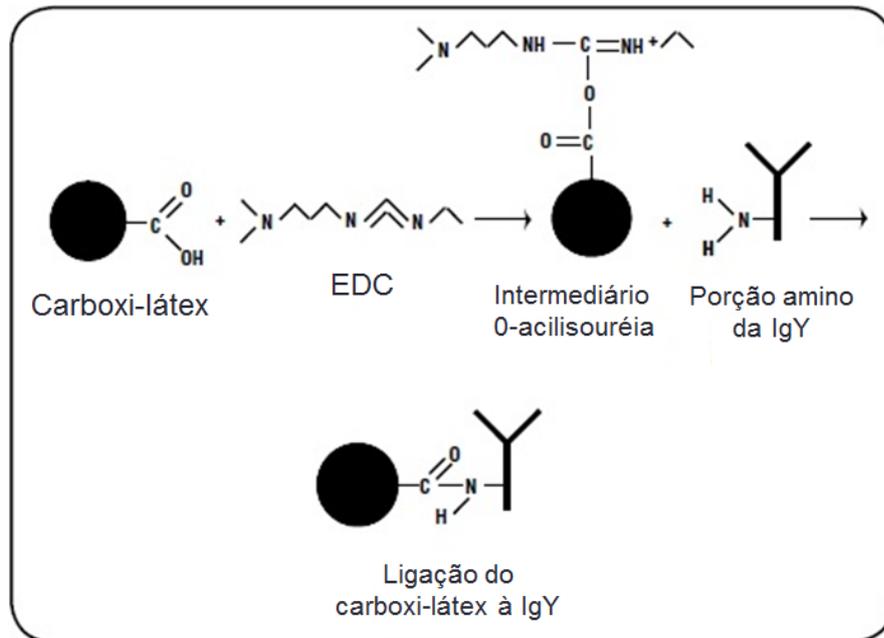


Figura 7: Esquema representativo da ligação covalente entre o carboxi-látex e a IgY. EDC: cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida; C: carbono; O: oxigênio; N: nitrogênio, H: hidrogênio; OH: hidroxila; IgY: imunoglobulina Y. (Modificado de Covalent Coupling, Bangs Laboratories, EUA).

3.9 Teste de aglutinação em látex utilizando a IgY (LATEXY-ROTA)

Este teste se baseou em uma reação imunológica de aglutinação entre a suspensão fecal contendo o rotavírus e a IgY anti-RVA ligada de forma covalente à superfície de partículas de látex. A suspensão fecal consistiu na adição de 3,0 mL de solução tampão de Tris/Cálcio (100mM Tris; 1,5mM CaCl₂; pH7,2) a 0,3 g de amostra de fezes. A amostra foi então centrifugada a 2.500 rpm por 20 minutos a 4°C, transferindo 2 mL do sobrenadante para um novo tubo.

O LATEXY-ROTA consistiu em um sistema contendo: (a) Látex Reativo: suspensão de IgY anti-RVA conjugada ao látex, (b) Controle Negativo: PBS 1x pH 7,2, (c) Controle positivo: amostra sabidamente positiva para RVA, (d) Controle do Látex: soro normal de cabra (SNC) conjugado ao látex, (e) Cartões para leitura do resultado.

O método utilizado para a detecção da aglutinação foi por observação visual. Após adicionar 25 µL do látex com 25 µL da suspensão fecal em duplicata, a reação foi homogeneizada por 5 minutos e observada quanto à presença ou ausência de aglutinação e comparada com o controle negativo (Látex reativo + PBS 1x pH 7,4),

controle positivo (Látex reativo + amostra positiva para RVA) e o controle do látex (Látex conjugado com SNC + suspensão fecal).

3.10 Painel de amostras

Foram utilizadas 20 amostras de fezes provenientes do Centro de Referência Regional para Rotavíruses do LVCA/IOC-FIOCRUZ, coletadas no Projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FIOCRUZ sob o número de licença 311/06. Este painel consistiu em amostras positivas e negativas confirmadas através do algoritmo do Diagnóstico de Referência do LVCA para RV. Para confirmar se uma amostra é positiva para rotavírus, é realizado primeiramente um ensaio imunoenzimático (EIA) de captura utilizando o kit Premier™ Rotaclone® Meridian Bioscience, EUA), seguido da eletroforese dos onze segmentos do genoma de RNA, seguido então da confirmação e genotipagem por PCR convencional. As amostras negativas são triadas então para as outras gastroenterites por PCR convencional. O painel foi composto pelas seguintes amostras: RVA positivas (n=4), RVA negativas (n=4), norovírus positivas (n=4), astrovírus positivas (n=4) e adenovírus positivas (n=4). Paralelamente, foi feita a detecção por dois kits de aglutinação comerciais: Rotavírus Latex (Bioclin, Brasil) – Registro na ANVISA: 10269360128, e Virotect Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido) – Registro na ANVISA: 10008980034, conforme as indicações do fabricante.

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Programa MedCalc 13.0.6.0. O desempenho do teste de aglutinação em látex utilizando a IgY foi realizada através de parâmetros a seguir (Crowther, 2009):

Curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*): Descrição gráfica do desempenho de um teste de diagnóstico, representado pela relação entre a taxa de verdadeiros positivos a taxa de falso-positivos. Representa a precisão intrínseca do teste, sendo

ideal para a comparação de testes. A precisão global de um teste pode ser descrita como a área sobre a curva ROC, que confere também o *p valor* do teste.

Sensibilidade: é a capacidade de um teste diagnóstico de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. É calculada pelo número de verdadeiros positivos dividido pelo número de pessoas doentes.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\mathbf{VP}}{\mathbf{TP + FN}} \times 100, \text{ onde:}$$

VP = resultados verdadeiros positivos determinados com o teste de referência

FN = resultados falso-negativos.

Especificidade: é a capacidade de um teste de diagnóstico de detectar os indivíduos verdadeiros negativos, ou seja, de diagnosticar corretamente os sadios. É calculada pelo número de verdadeiros negativos dividido pelo número de pessoas sem a doença.

$$\text{Especificidade} = \frac{\mathbf{VN}}{\mathbf{VN + FP}} \times 100, \text{ onde:}$$

VN = resultados verdadeiros negativos determinados com o teste de referência

FP = resultados falso-positivos.

Valores preditivos do teste: É definido como a precisão de um teste de prever uma doença, e se divide em:

Valor preditivo positivo (VPP): é a proporção de doentes entre os positivos pelo teste, calculado pelo número de resultados verdadeiros positivos dividido pelo número de todos os resultados positivos do teste.

$$\text{VPP} = \frac{\mathbf{VP}}{\mathbf{VP + FP}} \times 100, \text{ onde:}$$

VP = resultados verdadeiros positivos determinados com o teste de referência,

FP = resultados falso-positivos.

Valor preditivo negativo (VPN): é a proporção de sadios (sem a doença) entre os negativos ao teste, calculado pelo número de resultados verdadeiros negativos dividido pelo número de todos os resultados negativos do teste.

$$\text{VPN} = \frac{\mathbf{VN}}{\mathbf{VN + FN}} \times 100, \text{ onde:}$$

VN = resultados verdadeiros negativos determinados com o teste de referência

FN = resultados falso-negativos.

Razão de verossimilhança: Usado para determinar o desempenho do teste de diagnóstico, indicando quantas vezes um teste é capaz de mudar a probabilidade de se ter a doença.

Razão de verossimilhança positiva (RVP): Indica a probabilidade de que um resultado positivo do teste seja esperado em um paciente doente, comparado com a probabilidade do mesmo resultado em um paciente saudável.

$$RVP = \frac{\text{Sensibilidade}}{(1 - \text{Especificidade})}$$

Razão de verossimilhança negativa (RVN): Indica a probabilidade de que um resultado negativo do teste seja esperado em um paciente saudável, comparado com a probabilidade do mesmo resultado em um paciente doente.

$$RVN = \frac{(1 - \text{Sensibilidade})}{\text{Especificidade}}$$

Eficiência: Determina a proporção de diagnósticos corretos do teste de diagnóstico, calculando a relação entre o número de resultados corretos no teste e o total de indivíduos testados (N).

$$\text{Eficiência} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{N}$$

VP = resultados verdadeiros positivos determinados com o teste de referência

VN = resultados verdadeiros negativos determinados com o teste de referência

4 RESULTADOS

4.1 Produção e purificação de rotavírus por cultura de células

A metodologia de purificação viral por gradiente de cloreto de céσιο foi eficaz para a obtenção de RVA (Figura 8).

A quantificação da concentração do RVA Wa após a purificação por gradiente de cloreto de céσιο foi de $2,2 \times 10^{10}$ cópias de RNA/mL, realizada através da técnica de PCR em Tempo Real, sendo esta suspensão viral utilizada para imunizar as aves poedeiras para produção da IgY anti-RVA.



Figura 8: Purificação de RVA por gradiente de cloreto de céσιο (CsCl), com densidade de 1,375 (Espejo, López e Arias, 1981; Zárate *et al.*, 2000).

4.2 Imunização das aves

4.2.1 Peso das aves

O acompanhamento sistemático do peso das aves confirmou a não interferência da manipulação provocada pela imunização nas etapas de desenvolvimento dos animais, ao longo do período de vida das aves, e o peso médio das aves foi aumentando de forma constante e homogênea entre os grupos experimentais (Figura 9).

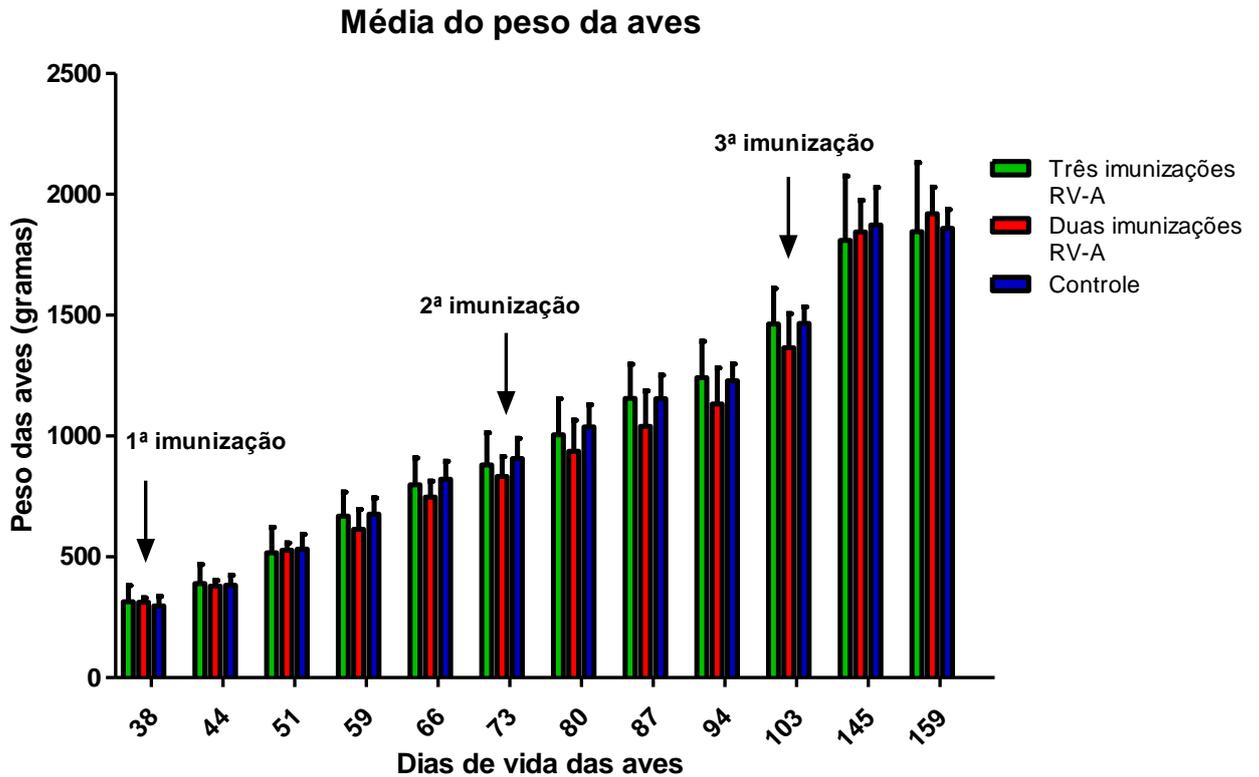


Figura 9: Acompanhamento do peso médio das aves após imunizações com RVA e controle.

4.2.2 Número de ovos coletados

Os ovos foram coletados por 13 semanas e separados de acordo com os grupos experimentais (Figura 10). Pode-se observar uma distribuição inicial pequena de número de ovos por semana, devido ao tempo diferente de maturação dos ovos pelas aves poedeiras, mas que depois tende a se estabilizar. O início da coleta dos ovos foi realizado aos 138 dias de vida das aves, e ao total, foram coletados 477 ovos.

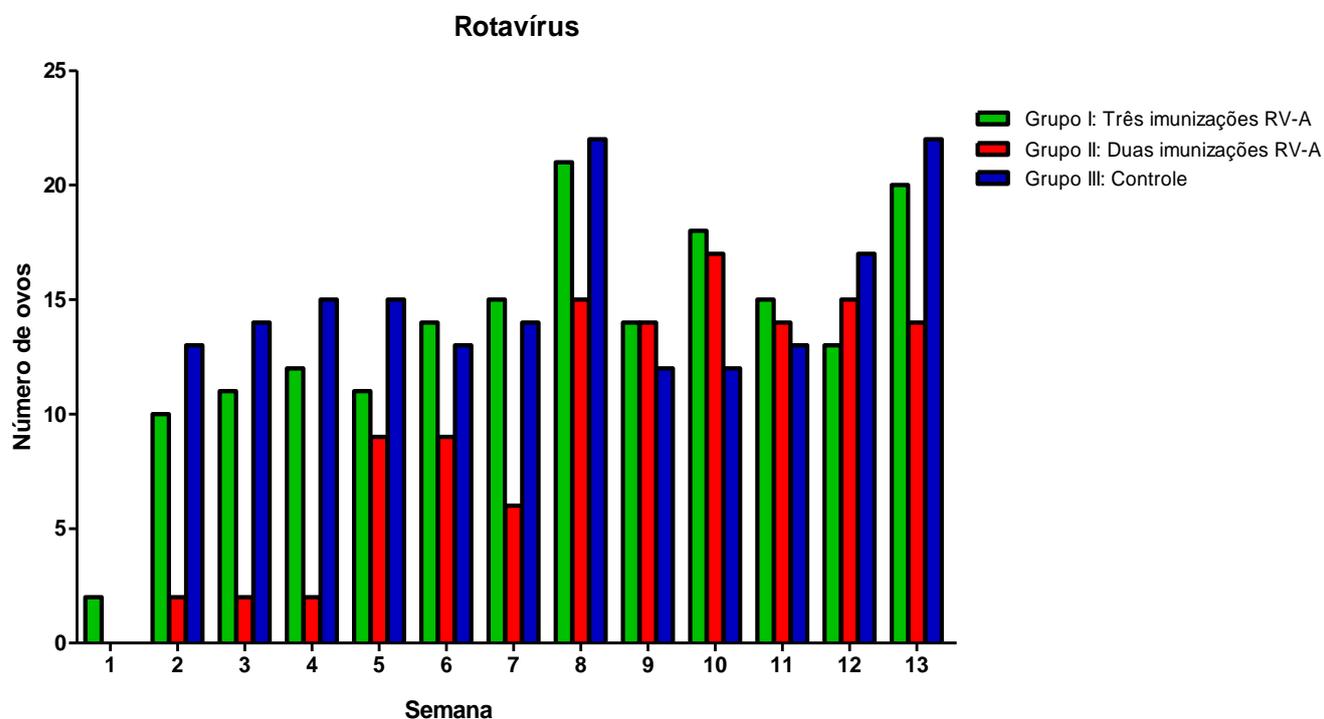


Figura 10: Distribuição do número de ovos coletados por grupo experimental nas 13 semanas após a imunização com RVA.

4.3 Purificação da IgY por PEG e quantificação da IgY

As concentrações em mg/mL obtidas após a purificação da IgY anti-RVA da gema do ovo por polietilenoglicol 6.000 podem ser observadas na Figura 11. Pode-se observar um aumento na concentração de proteínas totais ao longo das 13 semanas nos três grupos experimentais.

Concentração IgY anti-RV-A

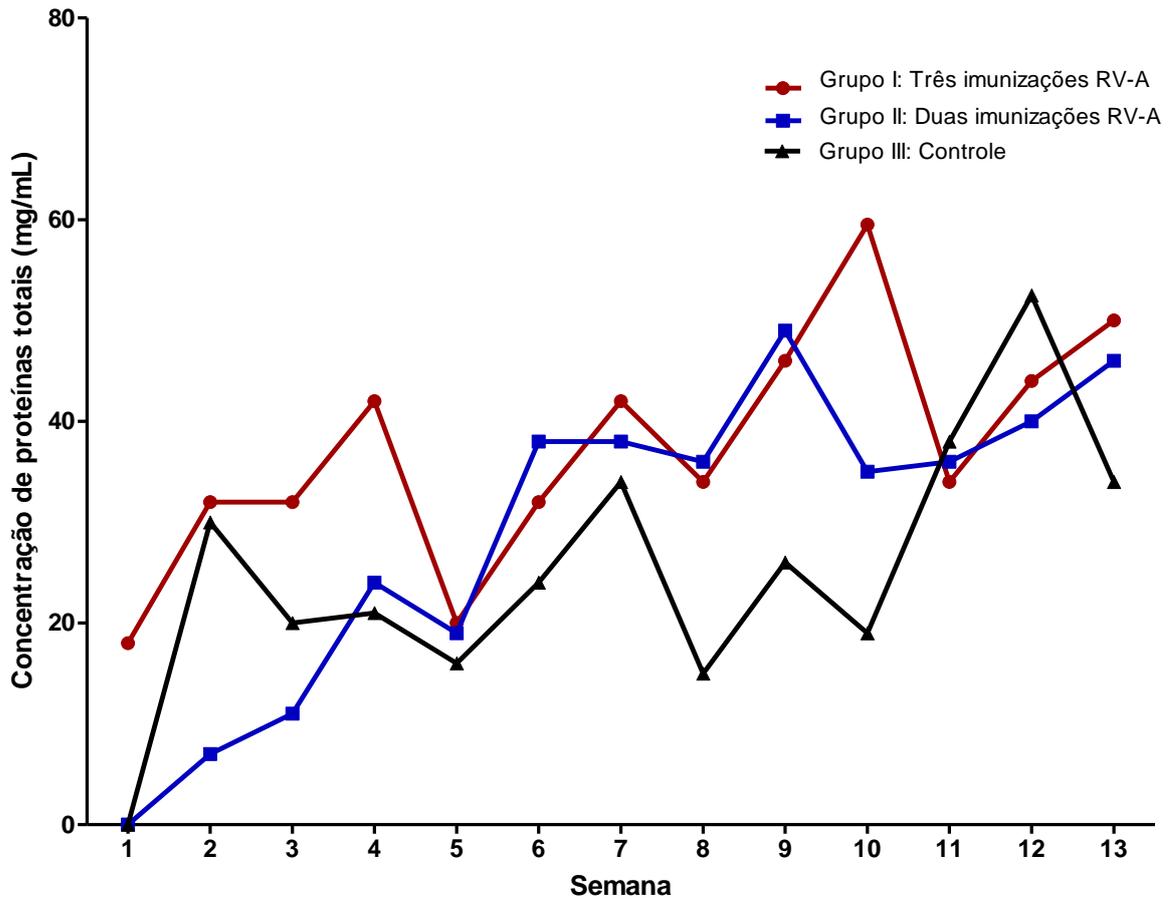


Figura 11: Concentração de IgY anti-RVA purificada da gema do ovo durante 13 semanas após a imunização (*pool* por semana).

4.4 Caracterização da IgY por SDS-PAGE

Após a separação da IgY por SDS-PAGE 12%, duas bandas foram observadas, que correspondem à cadeia pesada (70 kDa) e cadeia leve da IgY (21 kDa). No entanto, algumas outras proteínas contaminantes foram também observadas que corresponderia a produtos de clivagem de vitelogeninas, como apolipovitelina II (35 kDa) e fosvitina (40 kDa) (Figura 12).

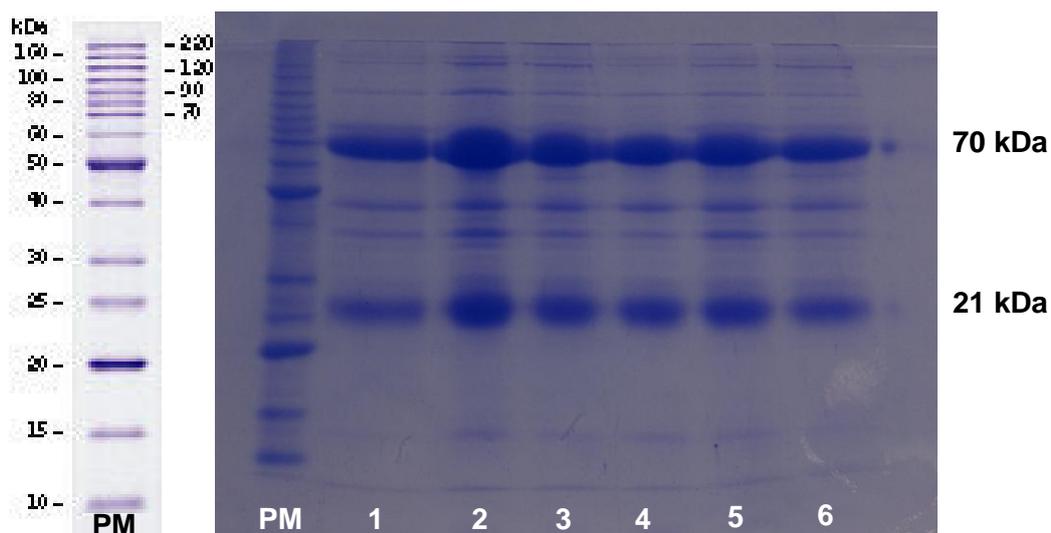


Figura 12: Gel SDS PAGE 12% da IgY purificada por PEG 6.000 do Grupo I, com três imunizações de RVA. Poços 1-6: Semanas 1-6, respectivamente (diluição 1:100). PM: Peso Molecular Bench Marck Protein Ladder (Life Technologies, EUA).

4.5 Determinação da especificidade da IgY ao rotavírus por Western Blotting

Foi observada a especificidade da IgY ao rotavírus por Western Blotting através da visualização das bandas específicas utilizando a IgY do grupo I e do grupo II, quando comparadas com o grupo III (grupo controle). Observa-se a presença de uma banda, que corresponderia à especificidade contra a proteína do capsídeo VP6 na Figura 13 (Esteban *et al.*, 2013).

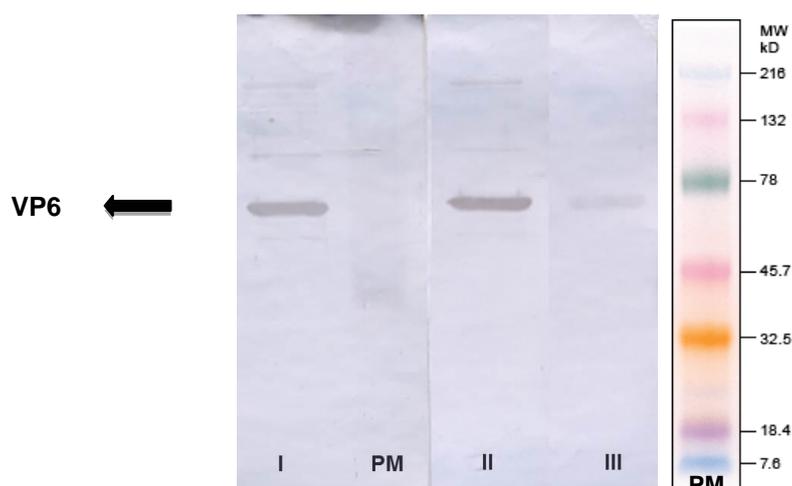


Figura 13: Western Blotting para determinação da especificidade da IgY anti-RVA. **PM:** Padrão de Peso Molecular pré-corado *Kaleidoscope* (Bio-Rad, EUA). **I:** IgY do Grupo I, com três imunizações de RVA; **II:** IgY do Grupo II, com duas imunizações de RVA; **III:** IgY do Grupo III (Controle).

4.6 Purificação adicional da IgY anti-RVA por cromatografia de troca iônica

A absorvância da concentração de IgY anti-RVA obtida por cromatografia de troca iônica pode ser visualizada na Figura 14 e as frações purificadas podem ser visualizadas na Figura 15, onde se observa um pico de liberação de IgY das frações 24 a 35. As frações purificadas foram agrupadas em pool, obtendo-se uma concentração final de 0,32 mg/ml.

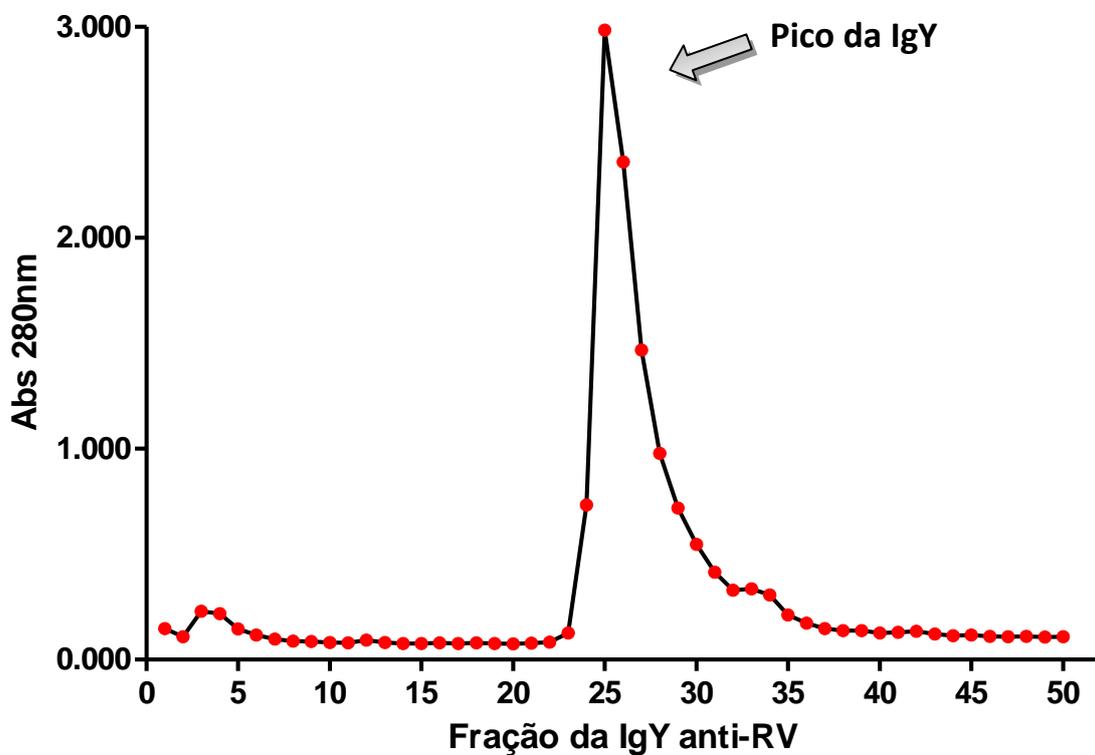


Figura 14: Absorbâncias das frações purificadas da IgY anti-RVA por Sepharose CL-6B.

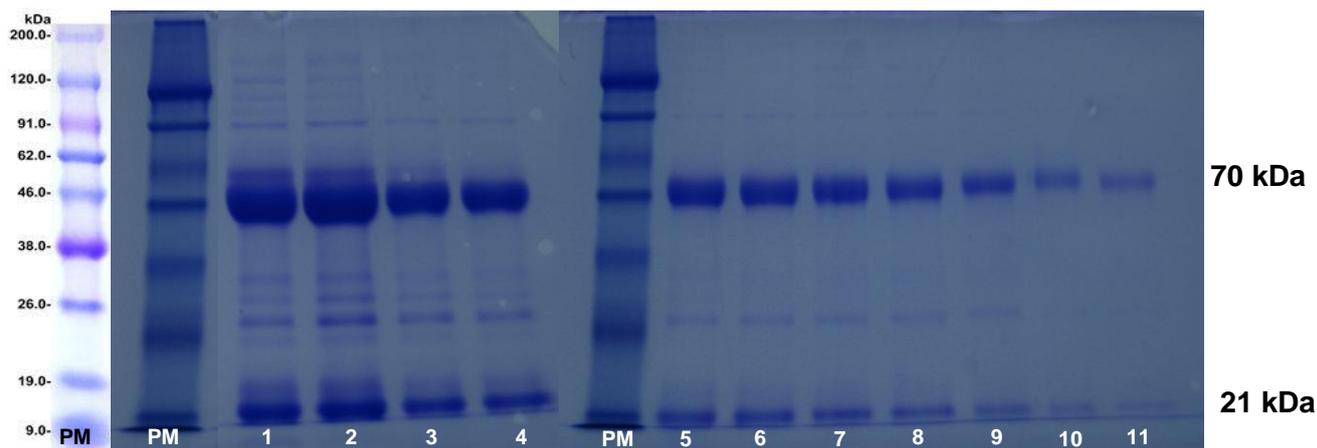


Figura 15: SDS PAGE 12% da IgY purificada por coluna de Sepharose CL-6B. PM: Padrão de Peso Molecular *Bluestep protein* (Amresco, EUA). Poços 1 a 11: Frações 24 a 35, respectivamente, da IgY purificada pela coluna.

4.7 Conjugação da IgY anti-RVA a partículas de poliestireno e visualização da aglutinação no LATEXY-ROTA

A conjugação da IgY anti-RVA à partículas de poliestireno após 5 minutos de homogeneização pode ser observada na Figura 16. Foi observada a presença de aglutinação após 30 minutos de incubação da IgY anti-RVA ligada do látex com uma solução de rotavírus purificado (poço 2), quando comparada com o controle negativo (poço 1) e o controle do látex (poço 3), que tiveram ausência de aglutinação.



Figura 16: Ensaio de aglutinação em látex utilizando a IgY anti-RVA 1: 25 μ L do látex 1% conjugado à IgY anti-RVA e 25 μ L do controle negativo (PBS 1x pH 7,4). 2: 25 μ L do látex 1% conjugado à IgY anti-RVA e 25 μ L do rotavírus purificado. 3: 25 μ L do látex 1% conjugado ao SNC e 25 μ L do rotavírus purificado.

4.8 Avaliação da aglutinação do LATEXY-ROTA em um painel de amostras

A conjugação da IgY anti-RVA à partículas de poliestireno após 5 minutos de homogeneização pode ser observada na Figura 17. Foi observada a presença de aglutinação após 30 minutos de incubação da IgY anti-RVA ligada do látex com uma amostra positiva (A – poços 4 e 5) e a ausência de aglutinação com uma amostra negativa (B – poços 4 e 5), quando comparada com o controle negativo (poço 1) e o controle do látex (poço 3), que tiveram ausência de aglutinação, e com o controle positivo (poço 2), onde a presença de aglutinação foi observada.

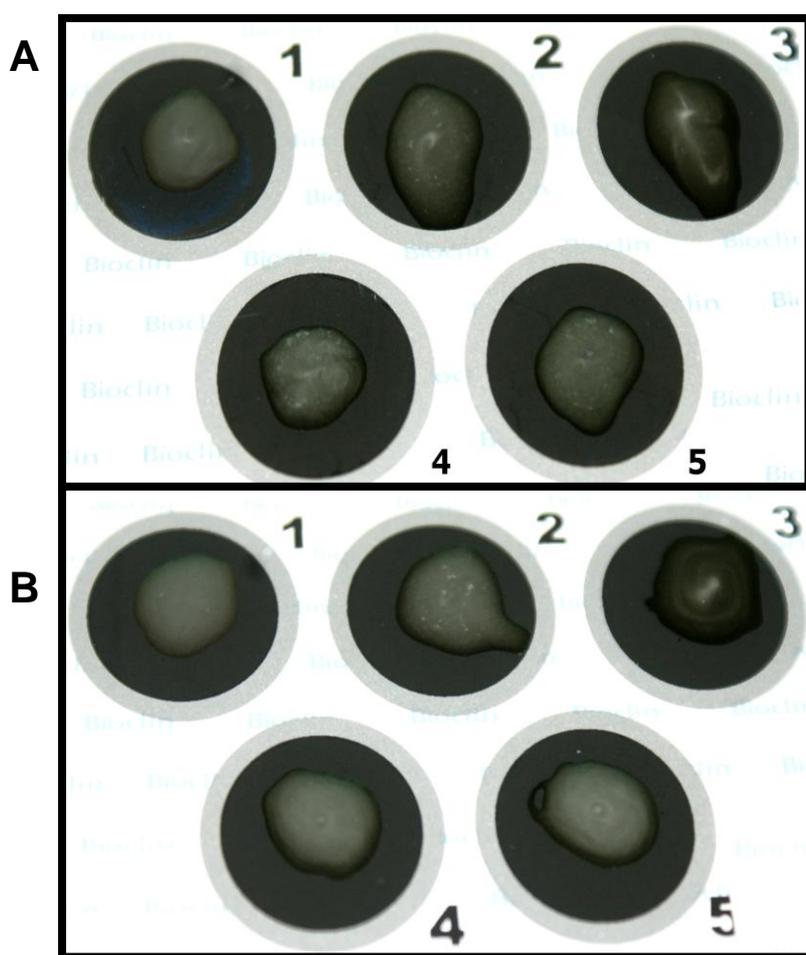


Figura 17: Reação de aglutinação no LATEXY-ROTA. **A:** Amostra Positiva. **B:** Amostra Negativa: **1:** 25 μ L do látex 1% conjugado à IgY e 25 μ L do controle negativo (PBS 1x pH 7,4). **2:** 25 μ L do látex 1% conjugado à IgY e 25 μ L do controle positivo. **3:** 25 μ L do látex 1% conjugado a SNC e 25 μ L da amostra. **4 e 5:** duplicata da reação - 25 μ L do látex 1% conjugado à IgY e 25 μ L da amostra.

4.9 Comparação da reação de aglutinação em imunoenaios comerciais utilizando IgG

A reação de aglutinação em dois imunoenaios comerciais de aglutinação, Rotavírus Latex (Bioclin, Brasil) e Virotect Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido), conforme as condições do fabricante pode ser observada na Figura 18. Foi observada a presença de aglutinação com uma amostra positiva (parte superior) nos dois imunoenaios comerciais (A e B - poços 4 e 5) e a ausência de aglutinação com uma amostra negativa (parte inferior) nos dois imunoenaios comerciais (A e B - poços 4 e 5), quando comparada com o controle negativo (poço 1) e o controle do látex (poço 3), que tiveram ausência de aglutinação, e com o controle positivo (poço 2), onde a presença de aglutinação foi observada.

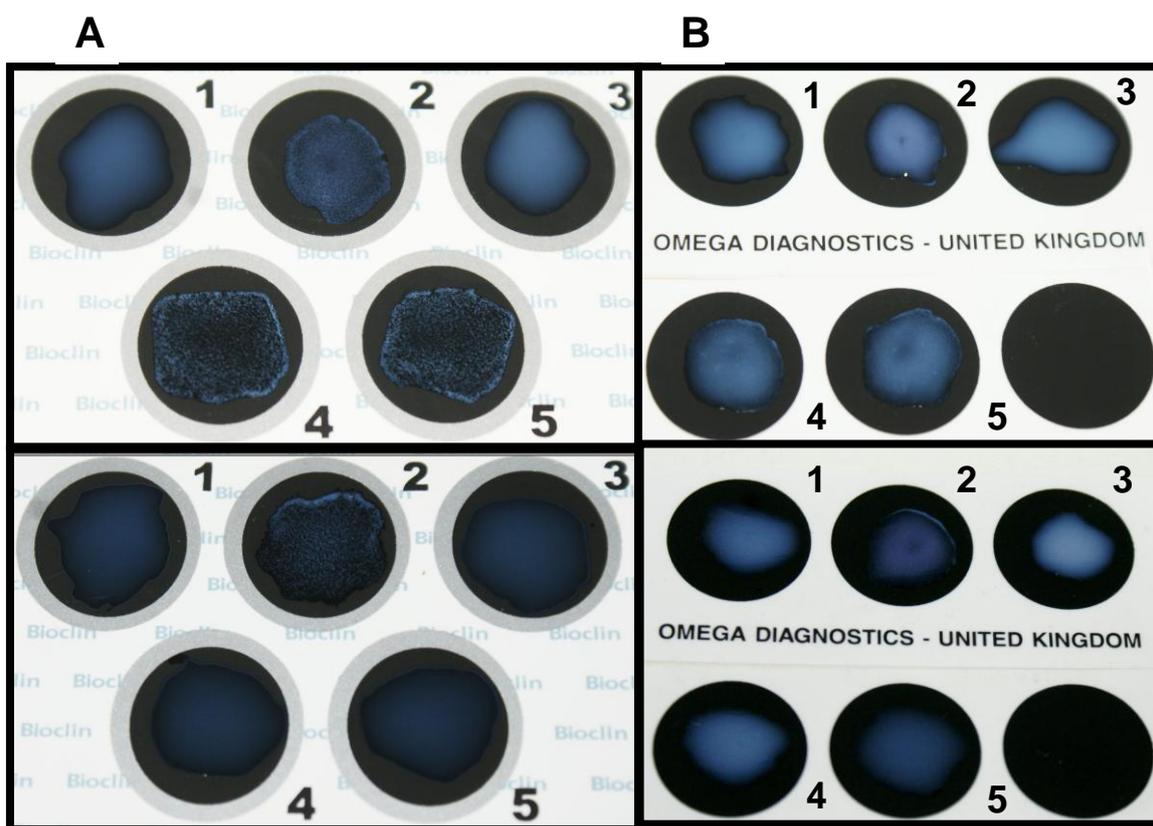


Figura 18: Reação de aglutinação de amostras nos imunoenaios comerciais de aglutinação em látex. Parte superior: amostra positiva. Parte inferior: amostra negativa. **A:** Rotavírus Latex (Bioclin, Brasil). **B:** Virotect Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido). **1:** 25 μ L do látex 1% conjugado à IgY e 25 μ L do controle negativo (PBS 1x pH 7,4). **2:** 25 μ L do látex 1% conjugado à IgY e 25 μ L do controle positivo. **3:** 25 μ L do látex 1% conjugado a SNC e 25 μ L da amostra. **4 e 5:** duplicata da reação - 25 μ L do látex 1% conjugado à IgY e 25 μ L da amostra.

4.10 Avaliação da sensibilidade e especificidade do LATEXY-ROTA

Os resultados da aglutinação do LATEXY-ROTA no painel de amostras pode ser observado na Tabela 2, comparado com os dois imunoenaios comerciais Rotavirus Látex, Virotect Rota e o fluxograma do Diagnóstico de Referência do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental. Para confirmar uma amostra positiva para rotavírus, é realizado primeiramente um ELISA de captura utilizando o kit Premier™ Rotaclone® (Meridian Bioscience, EUA), seguido da eletroforese do RNA viral, seguido então da confirmação e genotipagem por PCR convencional. As amostras negativas são triadas então para as outras gastroenterites por PCR convencional. Ao comparar com o Diagnóstico de referência, pode-se observar que a presença da aglutinação pelo LATEXY-ROTA em 3 de 4 amostras positivas para RVA (amostras 13, 19 e 20) e a ausência de aglutinação em 14 de 16 amostras negativas para RVA (Tabela 3). Dessas amostras negativas, 4 de 4 amostras eram negativas para RVA e para todas as outras três gastroenterites virais (astrovírus, adenovírus e norovírus); 4 de 4 amostras eram negativas para RVA, mas positivas para adenovírus; 3 de 3 amostras eram negativas para RVA, mas positivas para astrovírus; 3 de 4 eram negativas para RVA, mas positivas para norovírus. Foi obtido um resultado falso-positivo em uma amostra coinfectedada com astrovírus e adenovírus (amostra 3) e em uma amostra positiva para norovírus (amostra 11), sendo que duas amostras (11 e 13) também aglutinaram no controle do látex.

Comparando o resultado de aglutinação em látex do ensaio utilizando a IgY (LATEXY-ROTA) com os dois imunoenaios comerciais Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil) e Virotect Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido) nas Tabela 2, 5 e 7, o LATEXY-ROTA conseguiu detectar 3 de 3 amostras positivas para RVA (amostras 13, 19 e 20) e 15 de 17 amostras negativas para RVA pelos imunoenaios de aglutinação em látex comerciais. Foi obtido um resultado falso-positivo nas amostras 3 e 11, sendo que duas amostras (11 e 13) também aglutinaram no controle do látex.

Tabela 2: Comparação dos resultados de aglutinação em látex obtidos do látex utilizando a IgY (LATEXY-ROTA) com testes disponíveis comercialmente.

Teste de aglutinação	Rotavírus	Norovírus	Astrovírus	Adenovírus	Negativo ¹
LATEXY-ROTA	3/4	1/4 ²	1/4	0/4	0/4
Rotavírus látex	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Virotect Rota	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4
Diagnóstico de Referência	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4

¹Negativo = amostras negativas para as quatro gastroenterites: rotavírus, norovírus, astrovírus, adenovírus.

²A amostra positiva no LATEXY-ROTA: coinfeção norovírus/adenovírus.

4.11 Análise estatística

A Tabela 3 mostra a relação entre a aglutinação das amostras do látex utilizando a IgY anti-RVA (LATEXY-ROTA) quando comparado com o Diagnóstico de Referência. Foi observada a aglutinação em 3 de 4 amostras positivas para RVA e a ausência de aglutinação em 14 de 16 amostras negativas para RVA, com a observação de dois resultados falso-positivos.

Tabela 3: Relação entre os resultados positivos e negativos da reação de aglutinação em látex do LATEXY-ROTA, quando comparada com o Diagnóstico de Referência.

		DIAGNÓSTICO DE REFERÊNCIA		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
LATEXY-ROTA	POSITIVO	3	2	5
	NEGATIVO	1	14	15
TOTAL		4	16	20

A curva ROC realizada no Programa MedCalc foi obtida comparando o LATEXY-ROTA com o Diagnóstico de Referência, e pode ser observada na Figura 19 uma sensibilidade de 75% e especificidade de 87,5%.

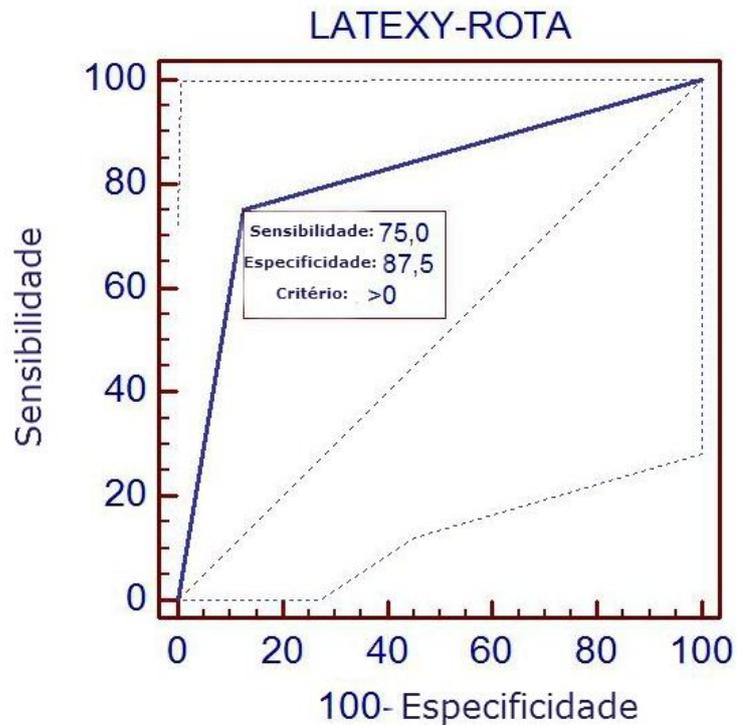


Figura 19: Curva ROC da comparação do LATEXY-ROTA com o Diagnóstico de Referência

Os resultados de sensibilidade, especificidade, razão de verossimilhança positiva (RVP), razão de verossimilhança negativa (RVN), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e área sobre a curva (AUC) podem ser visualizados na Tabela 4:

Tabela 4: Desempenho do teste de aglutinação em látex utilizando a IgY anti-RVA (LATEXY-ROTA) em comparação com o Diagnóstico de Referência.

Diagnóstico de Referência x LATEXY-ROTA	IC (95%)
Sensibilidade	75,0% (19,4-99,4)
Especificidade	87,5% (61,7-98,4)
Razão de Verossimilhança Positiva	6,00 (1,5-24,7)
Razão de Verossimilhança Negativa	0,29 (0,05-1,6)
Valor Preditivo Positivo	60% (14,7-94,7)
Valor Preditivo Negativo	93,3% (68,1-99,8)
Área Sobre a Curva	0,813 (0,577-0,949), p= 0,0180
Eficiência	85%

A Tabela 5 mostra a relação entre a aglutinação das amostras do látex utilizando a IgY anti-RVA (LATEXY-ROTA) quando comparado com o Rotavírus Latex (Bioclin, Brasil). O LATEXY-ROTA conseguiu detectar 3 de 3 amostras positivas para RVA e 15 de 17 amostras negativas para RVA, com a observação de dois resultados falso-positivos.

Tabela 5: Relação entre os resultados positivos e negativos da reação de aglutinação do LATEXY-ROTA, quando comparada com o Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil).

		ROTAVIRUS LATEX		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
LATEXY-ROTA	TOTAL POSITIVO	3	2	5
	TOTAL NEGATIVO	0	15	15
	TOTAL	3	17	20

Uma segunda curva ROC foi obtida comparando o LATEXY-ROTA com o imunoenensaio comercial Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil) e pode ser observada na Figura 20 uma sensibilidade de 100% e especificidade de 88,24%.

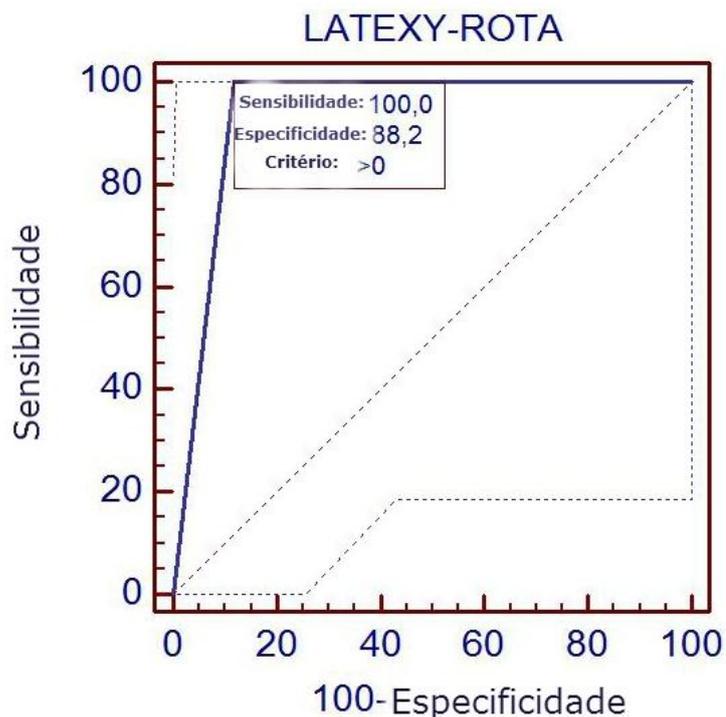


Figura 20: Curva ROC da comparação do LATEXY-ROTA com o Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil).

Os resultados de sensibilidade, especificidade, RVP, RVN, VPP, VPN e AUC podem ser visualizados na Tabela 6:

Tabela 6: Desempenho do teste de aglutinação em látex utilizando a IgY anti-RVA (LATEXY-ROTA) com o imunoenensaio comercial Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil):

Rotavirus Latex x LATEXY-ROTA	IC (95%)
Sensibilidade	100,0% (29,2-100,0)
Especificidade	88,24% (63,6-98,5)
Razão de Verossimilhança Positiva	8,50 (2,3-31,2)
Razão de Verossimilhança Negativa	0,00 (0,00-0,00)
Valor Preditivo Positivo	60% (14,7-94,7)
Valor Preditivo Negativo	100% (78,2-100,0).
Área Sobre a Curva	0,941 (0,739-0,998), p,<0,0001.
Eficiência	90%

A Tabela 7 mostra a relação entre a aglutinação das amostras do látex utilizando a IgY anti-RVA (LATEXY-ROTA) quando comparado com o Virotest Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido): O LATEXY-ROTA conseguiu detectar 3 de 3 amostras positivas para RVA e 15 de 17 amostras negativas para RVA, com a observação de dois resultados falso-positivos.

Tabela 7: Relação entre os resultados positivos e negativos da reação de aglutinação do LATEXY-ROTA, quando comparada com o Virotest Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido):

		VIROTECT ROTA		
		POSITIVO	NEGATIVO	TOTAL
LATEXY-ROTA	TOTAL POSITIVO	3	2	5
	TOTAL NEGATIVO	0	15	15
TOTAL		3	17	20

Uma terceira curva ROC foi obtida comparando o LATEXY-ROTA com o imunoensaio comercial Rotavirus Latex (Bioclin, Brasil) e pode ser observada na Figura 21 uma sensibilidade de 100% e especificidade de 88,24%.

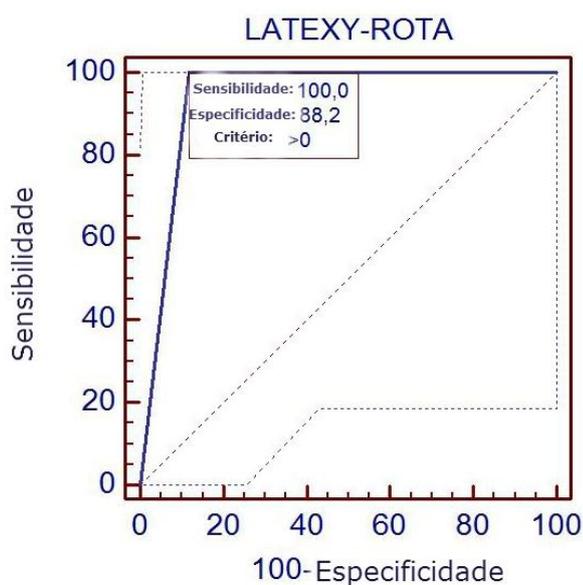


Figura 21: Curva ROC da comparação do LATEXY-ROTA com o Virotec Rota (Meridian Bioscience, EUA).

Os resultados de sensibilidade, especificidade, RVP, RVN, VPP, VPN e AUC podem ser visualizados na Tabela 8:

Tabela 8: Desempenho do teste de aglutinação em látex utilizando a IgY (LATEXY-ROTA) em comparação com o imunoenensaio comercial Virotest Rota (Meridian Bioscience, EUA):

Virotest Rota x LATEXY-ROTA	IC (95%)
Sensibilidade	100,0% (29,2-100,0)
Especificidade	88,24% (63,6-98,5)
Razão de Verossimilhança Positiva	8,50 (2,3-31,2)
Razão de Verossimilhança Negativa	0,00 (0,00-0,00)
Valor Preditivo Positivo	60% (14,7-94,7)
Valor Preditivo Negativo	100% (78,2-100,0)
Área Sobre a Curva	0,941 (0,739-0,998), p,<0,0001.
Eficiência	90%

5 DISCUSSÃO

Cerca de 430.000 mortes por ano no mundo ocorrem devido à diarreia e desidratação causada pela infecção por rotavírus, principalmente em crianças menores de cinco anos de idade. O diagnóstico correto e eficaz de uma gastroenterite causada por rotavírus é de grande importância com o objetivo de diminuir a taxa de mortalidade nessa faixa etária. (Tate *et al.*, 2012).

A detecção de rotavírus durante o pico de eliminação viral nas fezes, correspondendo dos 2 aos 4 dias de início dos sintomas, é primordial, pois são eliminados cerca de 10^{10} partículas virais nessa fase aguda da doença (Desselberger, 1999).

Os métodos de diagnóstico disponíveis, como o EIA, PAGE e RT-PCR, são os comumente utilizados pelos laboratórios de referência, sendo os testes rápidos como o ICG e o teste de aglutinação em látex mais voltados para triagem, uso em laboratórios de análises clínicas, e casos de surto (Gentsch, Gray, Iturriza-Gómara, Klena e Kirkwood, 2009; Paho, 2010).

Utilizar frangas poedeiras para a produção de anticorpos específicos para a detecção de um determinado antígeno é uma metodologia em concordância com o padrão bioético atual, pela obtenção não invasiva de anticorpos policlonais, sendo primeiramente descrito há mais de 100 anos atrás. A produção de anticorpos IgY ocorre através da sua alta concentração na gema de ovo, daí o termo *immunoglobulin of egg yolk* (IgY) (Tini *et al.*, 2002).

Neste trabalho é ressaltada a aplicabilidade da IgY em ensaios de aglutinação em látex como método alternativo no diagnóstico de rotavírus, que apresenta diversas vantagens, como o uso da IgY a partir da distância filogenética entre aves e mamíferos. Essa diferença melhora a probabilidade de que uma resposta imune seja induzida contra antígenos ou epítomos que podem não ser imunogênicos em mamíferos (Spillner *et al.*, 2012).

O uso da gema de ovo de frangas como fonte para a produção de anticorpos representa uma redução do uso de animais, pois as aves produzem maiores quantidades de anticorpos do que roedores e lagomorfos de laboratório. Também torna possível eliminar a coleta de sangue, diminuindo o sofrimento do animal e

contribuindo para o refinamento da obtenção de anticorpos (Schade e Hlinak, 1996; Schade *et al.*, 2005).

As etapas de produção e purificação da IgY utilizadas desse projeto foram aprimoradas a partir de um projeto inicial de produção de IgY para hepatite A (De Paula *et al.*, 2011). O desenvolvimento de uma metodologia para purificar a IgY da gema se faz necessário para a obtenção de um anticorpo sem interferentes, o que contribui para o aumento da eficácia do método de diagnóstico, aumentando sua sensibilidade e da especificidade. O látex tem a vantagem de ser rápido, prático, e poder ser aplicado em locais de difícil acesso.

Quanto à purificação da IgY anti-RVA desse trabalho, primeiramente as amostras de IgY foram purificadas pelo método de Polson por precipitação por PEG (Polson *et al.*, 1985), seguidas de uma purificação adicional por cromatografia de troca iônica. O método de PEG utilizado é fácil, rápido e barato, porém, muitos interferentes permanecem na amostra, principalmente lipídeos. Apesar de já ter sido descrito na literatura uma pureza de 96% na purificação por PEG, outros artigos relatam proteínas contaminantes (Schwarzkopf e Thiele, 1996).

O PEG também é conhecido por ser um interferente em imunoenaios (Ellis e Livesey, 2005), daí a necessidade desse trabalho em realizar uma purificação adicional. Apesar da alta concentração obtida pela precipitação por PEG, foi observado um baixo rendimento após a purificação por cromatografia. Faz-se necessário o uso de uma coluna específica para purificação da IgY, como uma coluna de adsorção tiofílica, que já foi descrita por rendimentos maiores de 80% (Gee *et al.*, 2003).

Outros trabalhos relatam a eficiência de purificação por outros métodos, como Meenatchisundaram e colaboradores, que compararam a eficácia da purificação de uma IgY anti-veneno da cobra *Echis carinatus* pelos seguintes métodos: diluição por água, método de Polson (Polson *et al.*, 1985) (PEG) com precipitação por sulfato de amônio, extração por clorofórmio e precipitação por sulfato de lítio e observaram que a IgY purificada por PEG com precipitação por sulfato de amônio apresentou um rendimento de 80% quando comparada com os outros métodos. (Meenatchisundaram e Michael, 2010).

Makvandi e colaboradores produziram uma IgY contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) em aves, purificaram pelo método de Polson com precipitação por sulfato de amônio, caracterizaram por eletroforese e confirmaram a especificidade por EIA obtendo uma sensibilidade de 73,1% e uma especificidade de 85,7% (Makvandi e Fiuzi, 2002).

A principal limitação da técnica de purificação da IgY é a dificuldade de eliminar a presença de proteínas e lipídeos contaminantes da amostra de IgY purificada. Um exemplo de proteínas rotineiramente contaminantes observadas por SDS-PAGE após a purificação da IgY são produtos de clivagem de vitelogeninas, como por exemplo, a apolipoproteína II (35 kDa) e a fosvitina (40 kDa) (Hatta *et al.*, 1993; Klimentzou *et al.*, 2006; Mann e Mann, 2008; Alvarez *et al.*, 2013).

A vantagem de usar a IgY em testes de aglutinação em látex reside no fato de a região Fc da IgY não se ligar aos receptores Fc de mamíferos, não ativando o sistema complemento e não interagindo com fator reumatóide (FR), um auto-anticorpo que reconhece a porção Fc da IgG e está relacionado à artrite reumatóide e outras doenças inflamatórias. Também não interage com anticorpos anti-mouse produzidos em humanos (HAMA) após a terapia de pacientes com anticorpos monoclonais murinos (mAb) (Johnson e Faulk, 1976). Assim, há um aumento significativo na especificidade da IgY, diminuindo os resultados falso positivos nos testes de diagnóstico e podendo ser utilizada na citometria de fluxo (Boscato e Stuart, 1988; Larsson, Karlsson-Parra e Sjöquist, 1991; Larsson *et al.*, 1992; Akita e Nakai, 1993; Larsson e Lindahl, 1993; Warr, Magor e Higgins, 1995; Carlander *et al.*, 2000; Dávalos-Pantoja *et al.*, 2000; Carlander, 2002; Tini *et al.*, 2002; Huang e Fang, 2008). Além disso, enquanto outras imunoglobulinas se ligam à proteína A do *Staphylococcus* sp ou proteína G do *Streptococcus* sp pela porção Fc, a IgY não se liga. Estudos também comprovam sua alta afinidade e avidéz (Tini *et al.*, 2002).

Embora a maioria dos artigos reforce as vantagens ao se utilizar a IgY no diagnóstico ao invés da IgG, pouco é discutido sobre as desvantagens e o que fazer para contorná-las. Muitos procedimentos de purificação foram aprimorados, mas ainda é uma dificuldade obter uma IgY com elevado grau de pureza associada à manutenção da atividade de reconhecimento antigênico. Alguns estudos também relatam que a IgY é mais propensa à desnaturação do que a IgG, o que dificultaria a

disponibilidade comercial desse anticorpo (Shimizu *et al.*, 1992; Shimizu, Nagashima e Hashimoto, 1993). Também já foi relatado que a afinidade e avidéz da IgY são menores do que a IgG, mas vários procedimentos de imunização surgiram para produzir uma IgY em quantidade e qualidade (Shimizu *et al.*, 1992; Shimizu, Nagashima e Hashimoto, 1993; Erhard *et al.*, 2000; Ortega-Vinuesa e Bastos-González, 2001).

Comparando o resultado de aglutinação em látex do ensaio utilizando a IgY (LATEXY-ROTA) com Diagnóstico de Referência nas Tabelas 2 e 3, pode-se observar que o LATEXY-ROTA conseguiu detectar 3 de 4 amostras positivas para RVA e 14 de 16 amostras negativas para RVA, porém obteve-se um resultado falso-positivo em uma amostra coinfectada com astrovírus e adenovírus. Duas amostras (11 e 13) aglutinaram também no controle do látex, o que indica que o controle do látex utilizando SNC não é satisfatório. Modificações devem então ser realizadas, visando estabelecer um melhor controle do látex.

O LATEXY-ROTA obteve uma sensibilidade de 75,0% (19,4-99,4) e uma especificidade de 87,5% (61,7-98,4) quando comparado com o Diagnóstico de Referência. Devido ao baixo número de amostras, os valores de especificidade foram menores do que o esperado, sendo necessário testar futuramente o LATEXY-ROTA em mais amostras e fazer um ajuste fino na conjugação com a IgY. No teste também foi obtido um valor de 6,00 para a razão de verossimilhança positiva e 0,29 (0,05-1,6) para a razão de verossimilhança negativa, o que confirma que a probabilidade de se confirmar a doença é alta, e a probabilidade de se excluir a doença é baixa, respectivamente. O VPP foi de 60% (14,7-94,7) e o VPN foi de 93,3% (68,1-99,8) onde o valor de VPP baixo indica que a proporção de doentes entre os resultados positivos foi baixa nesse teste, devido à baixa especificidade e poucas amostras positivas. A área sobre a curva (AUC) foi de 0,813 (0,577-0,949), e, por ser maior de 0,7, pode-se considerar que o desempenho do LATEXY-ROTA foi satisfatório, ou seja, a precisão global do teste foi eficaz em distinguir as amostras positivas das negativas, e o *p valor* foi igual a 0,0180, ou seja, houve significância estatística. Já a eficácia do teste comparando com o Diagnóstico de Referência, determinada pela relação de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos com o total de amostras, foi de 85%, um resultado considerado satisfatório.

Comparando o resultado de aglutinação em látex do ensaio utilizando a IgY (LATEXY-ROTA) com os dois imunoenaios comerciais Rotavírus Látex (Bioclin, Brasil) e Virotest Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido) nas Tabela 2, 5 e 7, o LATEXY-ROTA conseguiu detectar 3 de 3 amostras positivas para RVA e 15 de 17 amostras negativas para RVA pelos imunoenaios de aglutinação em látex comerciais.

Comparando-se a sensibilidade e a especificidade do LATEXY-ROTA com os dois imunoenaios comerciais Rotavírus Látex (Bioclin, Brasil) e Virotest Rota (Omega Diagnostics LTD, Reino Unido), foi observado que tanto a sensibilidade quanto a especificidade do LATEXY-ROTA em relação aos dois kits foram iguais, de 100,0% (29,2-100,0) e 88,24% (63,6-98,5), respectivamente. Observando-se a sensibilidade, pode-se concluir que o LATEXY-ROTA é tão sensível quanto os imunoenaios comerciais disponíveis. Os valores de verossimilhança positiva e verossimilhança negativa foram de 8,50 (2,3-31,2) e 0,00 (0,00-0,00), respectivamente, Já o VPP e o VPN foram de 60% (14,7-94,7) e 100% (78,2-100,0), e a área sob a curva (AUC) obtida foi de 0,941 (0,739-0,998), com $p < 0,0001$, que por ser maior de 0,7, pode-se considerar que o desempenho do LATEXY-ROTA foi satisfatório, ou seja, a precisão global do teste foi eficaz em distinguir as amostras positivas das negativas, com alta significância estatística.

A eficiência do teste em comparação com os imunoenaios comerciais, determinada pela relação de verdadeiros positivos e verdadeiros negativos com o total de amostras, foi de 95%, um resultado considerado satisfatório. Comparando os resultados do LATEXY-ROTA com a literatura, um ensaio de aglutinação em látex para detecção do antígeno capsular de *Actinobacillus pleuropneumoniae* ligou a IgG de forma covalente às partículas de poliestireno e foi capaz de detectar o antígeno em 49 amostras de swab nasal, pulmão e urina de animais infectados com *A. pleuropneumoniae*, com uma sensibilidade de 96% e especificidade de 100% quando comparada com a cultura bacteriana (Inzana, 1995).

Um ensaio de aglutinação em látex para detecção do vírus influenza aviário H5N1 foi utilizado para testar 90 amostras de aves e patos obtidas num surto de H5N1 em 2004. Nesse teste, onde uma IgG monoclonal de camundongo contra a proteína hemaglutinina do vírus H5N1 foi ligada de forma covalente ao látex,

obteve-se uma sensibilidade de 83,3%, especificidade de 100%, VPP de 100% e VPN de 92,3% quando comparado com o isolamento viral (Chen *et al.*, 2007).

Há um único trabalho da literatura que desenvolveu um teste de aglutinação em látex utilizando uma IgY anti-proteína A para detecção de *Staphylococcus aureus*, porém não é descrita a sensibilidade e especificidade do método (Larsson e Sjöquist, 1988; 1989).

Sabendo-se da importância desse trabalho de desenvolvimento tecnológico e do grande potencial de aplicação LATEXY-ROTA na rotina, espera-se aprimorar esse método de detecção a fim de aumentar a sua especificidade, permitindo o seu uso como teste de diagnóstico de infecções gastrointestinais causadas por RVA.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível obter uma IgY anti-RVA com especificidade confirmada por Western Blotting para o antígeno de interesse, que pode ser aplicada em um teste de aglutinação em látex;
- Foi realizada a conjugação da IgY a partículas de látex de forma eficiente, para o estabelecimento de um teste de aglutinação em látex;
- Foi possível detectar antígeno do rotavírus grupo A em amostras fecais através de um teste de aglutinação adaptado empregando anticorpo de captura IgY anti-RVA produzido em frangas imunizadas.
- A viabilidade da adaptação do teste de aglutinação em látex utilizando a IgY anti-RVA foi confirmada através da comparação da sensibilidade e especificidade com o Diagnóstico de Referência e com dois testes comerciais, obtendo-se um resultado satisfatório.

7 PERSPECTIVAS

- Testar o látex utilizando a IgY em um painel maior de amostras, comparando com o EIA e os kits comerciais de aglutinação em látex, a fim de se obter uma melhor sensibilidade e especificidade;
- Determinar a repetitividade, reprodutividade e sensibilidade analítica mínima relativa (limite de detecção) do teste utilizando a IgY;
- Testar o ensaio de aglutinação em látex utilizando a IgY em amostras fecais oriundas do modelo experimental de infecção por rotavírus do grupo A em *Macaca fascicularis*.
- Estabelecer um imunoensaio utilizando a IgY como captura para detecção de rotavírus em amostras fecais

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLHOCH, C. et al. Highly sensitive detection of the group A Rotavirus using Apolipoprotein H-coated ELISA plates compared to quantitative real-time PCR. **Viol J**, v. 8, p. 63, 2011. ISSN 1743-422X.

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. **J. Food Sci.**, v. 57, n. 3, p. 629-634, 1992.

AL-YOUSIF, Y. et al. Evaluation of a latex agglutination kit (Virogen Rotatest) for detection of bovine rotavirus in fecal samples. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 8, n. 3, p. 496-8, May 2001. ISSN 1071-412X.

ALVAREZ, A. et al. IgY antibodies anti-Tityus caripitensis venom: purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, v. 74, p. 208-14, Nov 2013. ISSN 1879-3150.

ASSIS, A. S. et al. Rotavirus epidemiology before and after vaccine introduction. **J Pediatr (Rio J)**, v. 89, n. 5, p. 470-6, 2013 Sep-Oct 2013. ISSN 1678-4782.

BAKEMA, J. E.; VAN EGMOND, M. Immunoglobulin A: A next generation of therapeutic antibodies? **MAbs**, v. 3, n. 4, p. 352-61, 2011 Jul-Aug 2011. ISSN 1942-0870.

BASTOS-GONZÁLES, D. et al. Carboxylated Latexes for Covalent Coupling Antibodies. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 176, p. 232–239, 1995.

BEARDS, G. M. A method for the purification of rotaviruses and adenoviruses from faeces. **J Virol Methods**, v. 4, n. 6, p. 343-52, Aug 1982. ISSN 0166-0934.

BERNARDI, G.; COOK, W. H. An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 44, p. 86-96, 1960.

BICER, S. et al. Incidence assessment of rotavirus and adenovirus associated acute gastroenteritis cases in early childhood. **Infez Med**, v. 19, n. 2, p. 113-9, Jun 2011. ISSN 1124-9390.

BISHOP, R. F. et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7841, p. 1281-3, Dec 1973. ISSN 0140-6736.

BLUTT, S. E. et al. IgA is important for clearance and critical for protection from rotavirus infection. **Mucosal Immunol**, v. 5, n. 6, p. 712-9, Nov 2012. ISSN 1935-3456.

BOSCATO, L. M.; STUART, M. C. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. **Clin Chem**, v. 34, n. 1, p. 27-33, Jan 1988. ISSN 0009-9147.

BRANDT, C. D. et al. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. **J Clin Microbiol**, v. 25, n. 9, p. 1800-2, Sep 1987. ISSN 0095-1137.

BUSER, J. et al. Comparison of a rotavirus latex agglutination test with two rapid immunochromatographic test devices for detection of rotavirus in human feces. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 20, n. 4, p. 295-6, Apr 2001. ISSN 0934-9723.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody: in vitro and in vivo**. 2002. (Doctor of Philosophy (Faculty of Medicine) in Clinical Chemistry). Faculty of Medicine, Uppsala University, Acta Universitatis Upsaliensis.

CARLANDER, D. et al. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunol Res**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2000. ISSN 0257-277X.

CHALGHOUMI, R. et al. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.**, v. 13, n. 2, p. 295-308, 2009.

CHALGHOUMI, R. et al. Adhesion and growth inhibitory effect of chicken egg yolk antibody (IgY) on *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in vitro. **Foodborne Pathog Dis**, v. 6, n. 5, p. 593-604, Jun 2009. ISSN 1556-7125.

CHANG, H. M. et al. Productivity and some properties of immunoglobulin specific against *Streptococcus mutans* serotype c in chicken egg yolk (IgY). **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 1, p. 61-6, Jan 1999. ISSN 0021-8561.

CHEN, J. et al. A latex agglutination test for the rapid detection of avian influenza virus subtype H5N1 and its clinical application. **J Vet Diagn Invest**, v. 19, n. 2, p. 155-60, Mar 2007. ISSN 1040-6387.

CHOUIKHA, A. et al. Relationship between electropherotypes and VP7/VP4 genotypes of group A rotaviruses detected between 2000 and 2007 in Tunisian children. **Pathol Biol (Paris)**, v. 59, n. 3, p. e43-8, Jun 2011. ISSN 1768-3114.

CICCARELLI, S.; STOLFI, I.; CARAMIA, G. Management strategies in the treatment of neonatal and pediatric gastroenteritis. **Infect Drug Resist**, v. 6, p. 133-161, 2013. ISSN 1178-6973.

CLARK, B.; MCKENDRICK, M. A review of viral gastroenteritis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 17, n. 5, p. 461-9, Oct 2004. ISSN 0951-7375.

COOPER, C. L. et al. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. **J Clin Immunol**, v. 24, n. 6, p. 693-701, Nov 2004. ISSN 0271-9142.

CORREIA, J. B. et al. Effectiveness of monovalent rotavirus vaccine (Rotarix) against severe diarrhea caused by serotypically unrelated G2P[4] strains in Brazil. **J Infect Dis**, v. 201, n. 3, p. 363-9, Feb 2010. ISSN 1537-6613.

CROWTHER, J. R. **The ELISA Guidebook**. Second Edition. Springer Protocols, 2009.

- DAS, B. K. et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **J Clin Microbiol**, v. 32, n. 7, p. 1820-2, Jul 1994. ISSN 0095-1137.
- DASH, S. K. et al. Detection of rotavirus from hospitalized diarrheic children in uttar pradesh, India. **Indian J Microbiol**, v. 52, n. 3, p. 472-7, Sep 2012. ISSN 0046-8991.
- DAVALOS-PANTOJA, L. et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 11, n. 6, p. 657-73, 2000. ISSN 0920-5063.
- DAVALOS-PANTOJA, L. et al. Colloidal stability of IgG- and IgY-coated latex microspheres. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 20, n. 2, p. 165-175, Feb 2001. ISSN 1873-4367.
- DAVIS, H. L. et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. **J Immunol**, v. 160, n. 2, p. 870-6, Jan 1998. ISSN 0022-1767.
- DE ALMEIDA, C. M. et al. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 2, p. 293-301, Aug 2008. ISSN 0041-0101.
- DE GÓES, A. C. et al. Development of a rapid and sensitive latex agglutination-based method for detection of group A rotavirus. **J Virol Methods**, v. 148, n. 1-2, p. 211-7, Mar 2008. ISSN 0166-0934.
- DE LA HOZ-RESTREPO, F. et al. Systematic review of incremental non-vaccine cost estimates used in cost-effectiveness analysis on the introduction of rotavirus and pneumococcal vaccines. **Vaccine**, v. 31 Suppl 3, p. C80-7, Jul 2013. ISSN 1873-2518.
- DE PAULA, V. S. et al. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. **J Virol Methods**, v. 171, n. 1, p. 102-6, 2011.
- DESSELBERGER, U. Rotavirus infections: guidelines for treatment and prevention. **Drugs**, v. 58, n. 3, p. 447-52, Sep 1999. ISSN 0012-6667.
- DESSELBERGER, U. et al. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **Br Med Bull**, v. 90, p. 37-51, 2009. ISSN 1471-8391.
- DO CARMO, G. M. et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **PLoS Med**, v. 8, n. 4, p. e1001024, Apr 2011. ISSN 1549-1676.
- DÁVALOS-PANTOJA, L. et al. A comparative study between the adsorption of IgY and IgG on latex particles. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 11, n. 6, p. 657-73, 2000. ISSN 0920-5063.
- EASTCOTT, J. W. et al. Oligonucleotide containing CpG motifs enhances immune response to mucosally or systemically administered tetanus toxoid. **Vaccine**, v. 19, n. 13-14, p. 1636-42, Feb 2001. ISSN 0264-410X.

EL KHOURY, A. C. et al. Projecting the effectiveness of RotaTeq® against rotavirus-related hospitalisations in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 541-5, Aug 2011. ISSN 1678-8060.

ELLIS, M. J.; LIVESEY, J. H. Techniques for identifying heterophile antibody interference are assay specific: study of seven analytes on two automated immunoassay analyzers. **Clin Chem**, v. 51, n. 3, p. 639-41, Mar 2005. ISSN 0009-9147.

ERHARD, M. H. et al. Evaluation of Various Immunisation Procedures in Laying Hens to Induce High Amounts of Specific Egg Yolk Antibodies. **ATLA**, v. 28, p. 63-80, 2000.

ESPEJO, R. T.; LÓPEZ, S.; ARIAS, C. Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. **J Virol**, v. 37, n. 1, p. 156-60, Jan 1981. ISSN 0022-538X.

ESTEBAN, L. E. et al. Antigenicity and immunogenicity of rotavirus VP6 protein expressed on the surface of *Lactococcus lactis*. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 298598, 2013. ISSN 2314-6141.

FERREIRA, M. S. et al. Assessment of gastroenteric viruses frequency in a children's day care center in Rio De Janeiro, Brazil: a fifteen year study (1994-2008). **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33754, 2012. ISSN 1932-6203.

FERREIRA, T. L. et al. Performance of a latex agglutination test in the diagnosis of acute gastroenteritis by rotavirus. **Braz. J. Microbiol.**, v. 37, p. 587-589, 2006.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Letter: Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, n. 7844, p. 1497, Dec 1973. ISSN 0140-6736.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Editora UFSM, 2012.

FU, C. Y. et al. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. **J Virol Methods**, v. 133, n. 1, p. 112-5, Apr 2006. ISSN 0166-0934.

GASSMANN, M. et al. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB J**, v. 4, n. 8, p. 2528-32, May 1990. ISSN 0892-6638.

GAUTAM, R. et al. Comparison of Premier™ Rotaclone®, ProSpecT™, and RIDASCREEN® rotavirus enzyme immunoassay kits for detection of rotavirus antigen in stool specimens. **J Clin Virol**, v. 58, n. 1, p. 292-4, Sep 2013. ISSN 1873-5967.

GEE, S. C. et al. The purification of IgY from chicken egg yolk by preparative electrophoresis. **Protein Expr Purif**, v. 30, n. 2, p. 151-5, Aug 2003. ISSN 1046-5928.

GENTSCH, J. et al. **Manual of rotavirus detection and characterization**: World Health Organization. WHO/IVB/08.17 2009.

GIRARD, F. et al. Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli*

infections. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 340-50, Apr 2006. ISSN 0928-8244.

GLICK, B.; CHANG, T. S.; JAAP, R. G. The bursa of Fabricius and antibody production. **Poult. Sci.**, v. 35, p. 224-234, 1956.

GOTTSTEIN, B.; HEMMELER, E. Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis. **Z Parasitenkd**, v. 71, n. 2, p. 273-6, 1985. ISSN 0044-3255.

HANSEN, P. et al. Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. **J Immunol Methods**, v. 215, n. 1-2, p. 1-7, Jun 1998. ISSN 0022-1759.

HATTA, H. et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 57, n. 3, p. 450-4, Mar 1993. ISSN 0916-8451.

HATTA, H. et al. Passive immunization against dental plaque formation in humans: effect of a mouth rinse containing egg yolk antibodies (IgY) specific to *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, v. 31, n. 4, p. 268-74, 1997. ISSN 0008-6568.

HE, Y.; BJORKMAN, P. J. Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 30, p. 12431-6, Jul 2011. ISSN 1091-6490.

HEMMI, H.; AKIRA, S. TLR signalling and the function of dendritic cells. **Chem Immunol Allergy**, v. 86, p. 120-35, 2005. ISSN 1660-2242.

HEMMI, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740-5, Dec 2000. ISSN 0028-0836.

HORTON, R. E.; VIDARSSON, G. Antibodies and their receptors: different potential roles in mucosal defense. **Front Immunol**, v. 4, p. 200, 2013. ISSN 1664-3224.

HUANG, L.; FANG, X. Immunoaffinity fractionation of plasma proteins by chicken IgY antibodies. **Methods Mol Biol**, v. 425, p. 41-51, 2008. ISSN 1064-3745.

HUGHES, J. H. et al. Latex immunoassay for rapid detection of rotavirus. **J Clin Microbiol**, v. 20, n. 3, p. 441-7, Sep 1984. ISSN 0095-1137.

INZANA, T. J. Simplified procedure for preparation of sensitized latex particles to detect capsular polysaccharides: application to typing and diagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. **J Clin Microbiol**, v. 33, n. 9, p. 2297-303, Sep 1995. ISSN 0095-1137.

JANEWAY, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. Editora Artmed, 2006.

JOHNSON, P. M.; FAULK, W. P. Rheumatoid factor: its nature, specificity, and production in rheumatoid arthritis. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 6, n. 3, p. 414-30, Nov 1976. ISSN 0090-1229.

KANG, G. et al. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. **J Med Virol**, v. 73, n. 1, p. 118-22, May 2004. ISSN 0146-6615.

KLEMPERER, F. Ueber natürliche Immunität und ihre Verwerthung für die Immunisirungstherapie. **Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie**, v. 31, n. 4-5, p. 356-382, 1893.

KLIMENTZOU, P. et al. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 183-93, Jan 2006. ISSN 0196-9781.

KLINMAN, D. M.; BARNHART, K. M.; CONOVER, J. CpG motifs as immune adjuvants. **Vaccine**, v. 17, n. 1, p. 19-25, Jan 1999. ISSN 0264-410X.

KOHNO, H. et al. Development of a simple and rapid latex test for rotavirus in stool samples. **Pediatr Int**, v. 42, n. 4, p. 395-400, Aug 2000. ISSN 1328-8067.

KOK, T. W.; BURRELL, C. J. Comparison of five enzyme immunoassays, electron microscopy, and latex agglutination for detection of rotavirus in fecal specimens. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 2, p. 364-6, Feb 1989. ISSN 0095-1137.

KOLLBERG, H. et al. Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. **Pediatr Pulmonol**, v. 35, n. 6, p. 433-40, Jun 2003. ISSN 8755-6863.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Microencapsulation for the gastric passage and controlled intestinal release of immunoglobulin Y. **J Immunol Methods**, v. 296, n. 1-2, p. 199-209, Jan 2005. ISSN 0022-1759.

KOVACS-NOLAN, J.; PHILLIPS, M.; MINE, Y. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 22, p. 8421-31, Nov 2005. ISSN 0021-8561.

KOWALCZYK, K. et al. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. **Immunology**, v. 54, n. 4, p. 755-62, Apr 1985. ISSN 0019-2805.

KUBELKA, C. F. et al. Murine experimental infection with rotavirus SA-11: clinical and immunohistological characteristics. **Exp Toxicol Pathol**, v. 45, n. 7, p. 433-8, Feb 1994. ISSN 0940-2993.

KVIETKAUSKAITE, R.; ACAITE, J. Evaluation of an ELISA for detection of antibodies to sendai virus in swine sera. **Turk J Vet Anim**, v. 28, p. 373-376, 2004.

LARSSON, A.; KARLSSON-PARRA, A.; SJÖQUIST, J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clin Chem**, v. 37, n. 3, p. 411-4, Mar 1991. ISSN 0009-9147.

LARSSON, A.; LINDAHL, T. L. Chicken antibodies: a tool to avoid interference in immunological assays. **Avian immunology in progress INRA**. 62: 97-104 p. 1993.

LARSSON, A.; SJÖQUIST, J. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. **J Immunol Methods**, v. 108, n. 1-2, p. 205-8, Apr 1988. ISSN 0022-1759.

LARSSON, A.; SJÖQUIST, J. Novel latex agglutination method with chicken anti-protein A for detection of Staphylococcus aureus infections. **J Clin Microbiol**, v. 27, n. 12, p. 2856-7, Dec 1989. ISSN 0095-1137.

LARSSON, A.; SJÖQUIST, J. Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 13, n. 4, p. 199-201, 1990. ISSN 0147-9571.

LARSSON, A. et al. Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA. **J Immunol Methods**, v. 156, n. 1, p. 79-83, Nov 1992. ISSN 0022-1759.

LEE, E. N. et al. In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium. **Poult Sci**, v. 81, n. 5, p. 632-41, May 2002. ISSN 0032-5791.

LEI, J. H. et al. Detection of circulating antigen in serum of mice infected with Schistosoma japonicum by immunomagnetic bead ELISA based on IgY. **Acta Trop**, v. 111, n. 1, p. 39-43, Jul 2009. ISSN 1873-6254.

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. **J Exp Med**, v. 130, n. 6, p. 1337-52, Dec 1969. ISSN 0022-1007.

LI, X. et al. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. **Poult Sci**, v. 77, n. 2, p. 266-70, Feb 1998. ISSN 0032-5791.

LINHARES, A. C. et al. [Duovirus (Rotavirus) in Belém, State of Para, Brazil (preliminary report)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 19, n. 4, p. 278-9, 1977 Jul-Aug 1977. ISSN 0036-4665.

LINHARES, A. C. et al. Burden and typing of rotavirus group A in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. **Rev Med Virol**, Mar 2011. ISSN 1099-1654.

LOGAN, C.; O'LEARY, J. J.; O'SULLIVAN, N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 9, p. 3189-95, Sep 2006. ISSN 0095-1137.

LÉVESQUE, S.; MARTINEZ, G.; FAIRBROTHER, J. M. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. **Poult Sci**, v. 86, n. 4, p. 630-5, Apr 2007. ISSN 0032-5791.

LUCHS, A. et al. Rotavirus in adults, Brazil, 2004-2011: G2P[4] dominance and potencial impact on vaccination. **Braz J Infect Dis**, v. 18, n. 1, p. 53-9, Sept 2013.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 6, p. 1292-305, Mar 2002. ISSN 1362-4962.

MAHMOOD, M. S. et al. Protection capability of recombinant plasmid DNA vaccine containing VP2 gene of very virulent infectious bursal disease virus in chickens adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotide. **Vaccine**, v. 24, n. 22, p. 4838-46, May 2006. ISSN 0264-410X.

MAKVANDI, M.; FIUZI, R. Purification of anti-HBsAg from egg yolks of immunized hens and its application for detection of HBsAg. **Arch Iranian Med**, v. 5, n. 2, p. 91-93, 2002.

MANN, K.; MANN, M. The chicken egg yolk plasma and granule proteomes. **Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 178-91, Jan 2008. ISSN 1615-9853.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch Virol**, v. 156, n. 8, p. 1397-413, Aug 2011. ISSN 1432-8798.

MATTHIJNSSENS, J. et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Arch Virol**, v. 157, n. 6, p. 1177-82, Jun 2012. ISSN 1432-8798.

MCCULLY, K. A.; MOK, C. C.; COMMON, R. H. Paper electrophoretic characterization of proteins and lipoproteins of hen's egg yolk. . **Can. J. Biochem. Physiol.** , v. 40, n. 7, p. 937-952, 1962.

MCGHEE, J. R.; FUJIHASHI, K. Inside the mucosal immune system. **PLoS Biol**, v. 10, n. 9, p. e1001397, 2012. ISSN 1545-7885.

MEBUS, C. A. **Calf diarrhea (Scours) : reproduced with a virus from a field outbreak.** 1969.

MEENATCHISUNDARAM, S.; MICHAEL, A. Comparison of four different purification methods for isolation of anti Echinococcus carinatus antivenom antibodies from immunized chicken egg yolk. **Iranian J. Biotechnol.** , v. 8, n. 1, p. 50-55, 2010.

MOLDOVEANU, Z. et al. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. **Vaccine**, v. 16, n. 11-12, p. 1216-24, Jul 1998. ISSN 0264-410X.

MOLINA-BOLÍVAR, J. et al. Agglutination kinetics of F(ab')₂ coated polymer colloids. **Colloid Polym Sci**, v. 276, p. 1117-1124, 1998.

MOLINA-BOLÍVAR, J. A.; GALISTEO-GONZÁLES, F. Latex Immunoagglutination Assays **J Macromol Sci Polymer Rev**, v. 45, p. 59-98, 2005.

MOLINA-BOLÍVAR, J. A.; GALISTEO-GONZÁLEZ, F.; HIDALGO-ALVAREZ, R. Latex immunoassays: comparative studies on covalent and physical immobilization of antibodies. I. F(ab')₂ fragments. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 9, n. 10, p. 1089-101, 1998a. ISSN 0920-5063.

MOLINA-BOLÍVAR, J. A.; GALISTEO-GONZÁLEZ, F.; HIDALGO-ALVAREZ, R. Latex immunoassays: comparative studies on covalent and physical immobilization of antibodies. II. IgG. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 9, n. 10, p. 1103-13, 1998b. ISSN 0920-5063.

MOMENZADEH, A. et al. Comparison of Enzyme Immunoassay, Immunochromatography, and RNA-Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for Diagnosis of Comparison of Enzyme Immunoassay, Immunochromatography, and RNA-Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for Diagnosis of Rotavirus Infection in Children with Acute Gastroenteritis. **Iran J Med Sci**, v. 33, n. 3, p. 173-176, 2008.

MORRISON, S. L. et al. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Mol Immunol**, v. 38, n. 8, p. 619-25, Jan 2002. ISSN 0161-5890.

NILSSON, E. et al. Proteomic characterization of IgY preparations purified with a water dilution method. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 24, p. 11638-42, Dec 2008. ISSN 1520-5118.

O'RYAN, M.; LUCERO, Y.; LINHARES, A. C. Rotarix®: vaccine performance 6 years postlicensure. **Expert Rev Vaccines**, v. 10, n. 12, p. 1645-59, Dec 2011. ISSN 1744-8395.

ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZÁLEZ, D. A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests. **J Biomater Sci Polym Ed**, v. 12, n. 4, p. 379-408, 2001. ISSN 0920-5063.

ORTEGA-VINUESA, J. L. et al. Characterization of Immunoglobulin G Bound to Latex Particles Using Surface Plasmon Resonance and Electrophoretic Mobility. **J Colloid Interface Sci**, v. 204, n. 2, p. 300-11, Aug 1998. ISSN 1095-7103.

PAHO. **Epidemiologic surveillance of diarrheal diseases due to rotavirus - Field guide.**: Pan American Health Organization 2010.

PAI, C. H.; SHAHRABADI, M. S.; INCE, B. Rapid diagnosis of rotavirus gastroenteritis by a commercial latex agglutination test. **J Clin Microbiol**, v. 22, n. 5, p. 846-50, Nov 1985. ISSN 0095-1137.

PANG, X. et al. Increased sensitivity for various rotavirus genotypes in stool specimens by amending three mismatched nucleotides in the forward primer of a real-time RT-PCR assay. **J Virol Methods**, v. 172, n. 1-2, p. 85-7, Mar 2011. ISSN 1879-0984.

PANG, X. L. et al. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. **J Med Virol**, v. 72, n. 3, p. 496-501, Mar 2004. ISSN 0146-6615.

PATH. Rotavirus vaccine access and delivery. Access: Jan 2014. Available at: <http://sites.path.org/rotavirusvaccine>

PEREIRA, H. G. et al. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **J Virol Methods**, v. 10, n. 1, p. 21-8, Jan 1985. ISSN 0166-0934.

PLOTZ, C. M.; SINGER, J. M. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. **Am J Med**, v. 21, n. 6, p. 888-92, Dec 1956. ISSN 0002-9343.

POLSON, A. et al. Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. **Immunol Invest**, v. 14, n. 4, p. 323-7, Aug 1985. ISSN 0882-0139.

RABONI, S. M. et al. Comparison of latex agglutination with enzyme immunoassay for detection of rotavirus in fecal specimens. **Am J Clin Pathol**, v. 117, n. 3, p. 392-4, Mar 2002. ISSN 0002-9173.

RAMANI, S.; KANG, G. Viruses causing childhood diarrhoea in the developing world. **Curr Opin Infect Dis**, v. 22, n. 5, p. 477-82, Oct 2009. ISSN 1473-6527.

RATCLIFFE, M. J. H. B Cells, The Bursa Of Fabricius And The Generation Of Antibody Repertoires. In: LTD., E. (Ed.). **Avian Immunology**, 2008.

SANEKATA, T.; YOSHIDA, Y.; OKADA, H. Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination. **J Immunol Methods**, v. 41, n. 3, p. 377-85, 1981. ISSN 0022-1759.

SARKER, S. A. et al. Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 32, n. 1, p. 19-25, Jan 2001. ISSN 0277-2116.

SARKER, S. A. et al. Successful treatment of rotavirus-induced diarrhoea in suckling mice with egg yolk immunoglobulin. **J Health Popul Nutr**, v. 25, n. 4, p. 465-8, Dec 2007. ISSN 1606-0997.

SCHADE, R. et al. **Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application: IgY-Technology**. Springer Lab Manuals, 2000.

SCHADE, R. et al. [Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies]. **ALTEX**, v. 11, n. 2, p. 75-84, 1994. ISSN 1868-596X.

SCHADE, R. et al. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Altern Lab Anim**, v. 33, n. 2, p. 129-54, Apr 2005. ISSN 0261-1929.

SCHADE, R.; HLINAK, A. Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects. **ALTEX**, v. 13, n. 5, p. 5-9, 1996. ISSN 1868-596X.

SCHADE, R. et al. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. **ATLA**, v. 24, p. 925-934, 1996.

SCHWARZKOPF, C.; THIELE, B. Effectivity of Different Methods for the Extraction and Purification of IgY. **ALTEX**, v. 13, n. 5, p. 35-39, 1996. ISSN 1868-596X.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; HASHIMOTO, K. Comparative studies in molecular stability of immunoglobulin G from different species. **Comp Biochem Physiol B**, v. 106, n. 2, p. 255-61, Oct 1993. ISSN 0305-0491.

SHIMIZU, M. et al. Molecular stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 56, n. 2, p. 270-4, Feb 1992. ISSN 0916-8451.

SHIN, J. H. et al. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 5, p. 1061-6, Sep 2002. ISSN 1071-412X.

SILVA, A. O. S. et al. An immunoenzymatic assay for the diagnosis of hepatitis A utilising immunoglobulin Y. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 7, p. 960-3, Nov 2012. ISSN 1678-8060.

SPILLNER, E. et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v. 40, n. 5, p. 313-22, Sep 2012. ISSN 1095-8320.

STILLS, H. F. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **ILAR J**, v. 46, n. 3, p. 280-93, 2005. ISSN 1084-2020.

STÜRENBURG, E.; JUNKER, R. Point-of-care testing in microbiology: the advantages and disadvantages of immunochromatographic test strips. **Dtsch Arztebl Int**, v. 106, n. 4, p. 48-54, Jan 2009. ISSN 1866-0452.

SUGITA-KONISHI, Y. et al. Blockade of *Salmonella enteritidis* passage across the basolateral barriers of human intestinal epithelial cells by specific antibody. **Microbiol Immunol**, v. 44, n. 6, p. 473-9, 2000. ISSN 0385-5600.

SVENDSEN, L. et al. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Lab Anim Sci**, v. 45, n. 1, p. 89-93, Feb 1995. ISSN 0023-6764.

TATE, J. E. et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect Dis**, v. 12, n. 2, p. 136-41, Feb 2012. ISSN 1474-4457.

THAN, V. T.; KIM, W. Prevalence of rotavirus genotypes in South Korea in 1989-2009: implications for a nationwide rotavirus vaccine program. **Korean J Pediatr**, v. 56, n. 11, p. 465-473, Nov 2013. ISSN 1738-1061.

- TINI, M. et al. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 131, n. 3, p. 569-74, Mar 2002. ISSN 1095-6433.
- TRABELSI, A. et al. Rotavirus strain diversity in the centre coast of Tunisia from 2000 through 2003. **J Infect Dis**, v. 202 Suppl, p. S252-7, Sep 2010. ISSN 1537-6613.
- TRASK, S. D.; MCDONALD, S. M.; PATTON, J. T. Structural insights into the coupling of virion assembly and rotavirus replication. **Nat Rev Microbiol**, v. 10, n. 3, p. 165-77, Mar 2012. ISSN 1740-1534.
- VEERASAMI, M. et al. Serotyping of foot-and-mouth disease virus by antigen capture-ELISA using monoclonal antibodies and chicken IgY. **New Microbiol**, v. 31, n. 4, p. 549-54, Oct 2008. ISSN 1121-7138.
- VEGA, C. et al. Egg yolk IgY: protection against rotavirus induced diarrhea and modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 142, n. 3-4, p. 156-69, Aug 2011. ISSN 1873-2534.
- VEGA, C. G. et al. IgY antibodies protect against human Rotavirus induced diarrhea in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42788, 2012. ISSN 1932-6203.
- VINCENT, I. E. et al. Inhibitory effect of the combination of CpG-induced cytokines with lamivudine against hepatitis B virus replication in vitro. **Antivir Ther**, v. 14, n. 1, p. 131-5, 2009. ISSN 1359-6535.
- WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunol Today**, v. 16, n. 8, p. 392-8, Aug 1995. ISSN 0167-5699.
- WEITZEL, T. et al. Field evaluation of a rota- and adenovirus immunochromatographic assay using stool samples from children with acute diarrhea in Ghana. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 2695-7, Aug 2007. ISSN 0095-1137.
- WEST, A. P.; HERR, A. B.; BJORKMAN, P. J. The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. **Immunity**, v. 20, n. 5, p. 601-10, May 2004. ISSN 1074-7613.
- WU, F. et al. The co-administration of CpG-ODN influenced protective activity of influenza M2e vaccine. **Vaccine**, v. 27, n. 32, p. 4320-4, Jul 2009. ISSN 1873-2518.
- YAP, K. L. Development of a slide latex agglutination test for rotavirus antigen detection. **Malays J Pathol**, v. 16, n. 1, p. 49-56, Jun 1994. ISSN 0126-8635.
- ZENG, S. Q. et al. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **J Virol Methods**, v. 153, n. 2, p. 238-40, Nov 2008. ISSN 0166-0934.
- ZÁRATE, S. et al. The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. **J Virol**, v. 74, n. 2, p. 593-9, Jan 2000. ISSN 0022-538X.

9 ANEXO: COMITÊ DE ÉTICA NO TRATO DE ANIMAIS - UNIFESO

NOME DO PROPONENTE:
Marcelo Alves Pinto

USO EXCLUSIVO DA CETA-UNIFESO

NÚMERO DA LICENÇA	DATA DE PROTOCOLO	DATA DE APROVAÇÃO
<u>0331/11</u>	<u>25/6/11</u>	<u>30/6/2011</u>

DATA DE VENCIMENTO: 30/6/2013



CENTRO UNIVERISTÁRIO SERRA DOS ÓRGÃOS

DECISÃO DA CETA – UNIFESO

Data da Reunião: 30/06/2011

Aprovado Aprovado com pendência Com pendências Reprovado

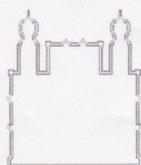
Comissão: Dem. de Luísa B. da S.

2º Carla F. de S.

3º Cláudia J. de S.

15

10 ANEXO: COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – FIOCRUZ



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 15 de maio de 2006.

PARECER

Título do Projeto: "Detecção e Identificação de Vírus Responsáveis pela Etiologia da Gastroenterite Aguda"
Protocolo CEP: 311/06
Pesquisador Responsável: José Paulo Gagliardi Leite
Instituição: IOC
Deliberação: APROVADO

O estudo tem como objetivos detectar rotavírus A e C, astrovírus, calicivírus humanos e adenovírus entéricos, em amostras fecais de gastroenterite agudas, além de implementar metodologias para a detecção de outros vírus, associados a estas infecções, com caracterização molecular e análises genealógicas, na busca de variações geográficas e/ou temporais.

Segundo a Organização Panamericana de Saúde as gastroenterites agudas são, após as infecções respiratórias agudas, constituem o mais importante agravo à saúde em crianças menores de cinco anos. Associados ao quadro de desnutrição, estas são responsáveis por mais de 3,3 milhões de mortes no mundo, sendo que um milhão destas ocorre na América Latina. O trabalho pretende identificar outros vírus gastroentéricos causadores de doenças em nosso meio, objetivando a criação de um Programa de Vigilância Epidemiológica e Laboratorial de detecção e caracterização molecular (identificação) de vírus, no sentido de auxiliar a avaliação do impacto na introdução da vacina em nosso país.

Trata-se de um projeto integrado, envolvendo atividades de Graduação e Pós-Graduação.

Serão utilizadas fezes obtidas de amostras encaminhadas para diagnóstico e identificação viral que estão armazenadas no laboratório, onde a pesquisa será executada, ou enviadas pelos LACENS, ou unidades hospitalares.

O projeto não oferece nenhum risco físico aos participantes com referência à obtenção do material biológico para estudo.

O TCLE está claro, com as informações necessárias.

A equipe envolvida no estudo é qualificada para tal e o projeto será desenvolvido no Laboratório de Referência para Rotavíruses, do Depto. de Imunologia, do Instituto Oswaldo Cruz.

Após análise das respostas às pendências emitidas no parecer datado de 28/04/2006 por este colegiado, tendo por referência as normas e diretrizes da Resolução 196/96, foi decidido pela APROVAÇÃO do referido protocolo.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais/anuais e relatório final do projeto de pesquisa.

Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo original deverá ser submetida para apreciação do CEP/Fiocruz.

Alda Maria Da-Cruz
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Em Seres Humanos da Fundação Oswaldo Cruz