

DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA DIAGNÓSTICO DO ROTAVÍRUS NAS FEZES UTILIZANDO IMUNOGLOBULINA Y (IGY) DE AVES IMUNIZADAS.

Aluna: **Pâmella Victória Gomes de Oliveira Conceição**
 Orientador: **Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos**
 Coorientador: **Alexandre dos Santos da Silva**

Lab. de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

INTRODUÇÃO

A produção de anticorpos em aves imunizadas seguida da extração desses anticorpos da gema dos ovos (IgY), tem atraído o interesse da comunidade científica. Esta abordagem oferece vantagens como: baixo custo, alta eficiência da técnica e é a mais adequada ao conceito bioético quando trata-se da manutenção e do manejo das aves. Neste presente estudo, objetiva-se desenvolver e avaliar um teste rápido de imunocromatografia de fluxo lateral utilizando uma IgY produzida contra o rotavírus (RV), a maior causa de morbidade e mortalidade de crianças menores de 5 anos em todo o mundo, especialmente em países em desenvolvimento. E um dos motivos de dificuldade no controle da doença é a escassez de testes diagnósticos capazes de diagnosticar em um curto período de tempo, a fim de que a criança seja conduzida ao tratamento de forma ágil e eficaz. Além disso, o desenvolvimento de novas alternativas mais baratas, também é importante para que o teste seja acessível a países com menos recursos financeiros. Para esta proposta, anticorpos IgY anti-RV produzidos em aves imunizadas (*Gallus gallus* da raça ISA Brown) foram purificados, para refinamento da imunoglobulina, a partir da gema dos ovos.

1ª ETAPA JÁ REALIZADA- IgY

ACOMODAÇÃO DAS AVES

✓ Frangas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) da raça Rhodia provenientes de matrizeiro comercial.

✓ Laboratório de Bioclimatologia da Faculdade de Medicina Veterinária da UNIFESO, nas seguintes condições:

- ♦ 12 horas de luz/12 horas de escuridão;
- ♦ Gaiolas individualizadas;
- ♦ Água e ração *ad libitum*;
- ♦ Temperatura entre 18-20°C;
- ♦ Umidade Relativa de 70-80%.



PROCEDIMENTO DE IMUNIZAÇÃO DAS AVES



Todos os procedimentos de acordo com Comissão de Ética no Trato com Animais da Fundação Educacional Serra dos Órgãos (CETA-UNIFESO). Licença 0331/11.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA IG Y

✓ Coleta dos ovos - 13 semanas

♦ Total de 477 ovos

✓ Purificação – Método de precipitação em polietileno glicol (PEG)

✓ Quantificação da IgY – Espectrofotometria

♦ Método de Lowry (1951) - (Proteínas Totais)

✓ Eletroforese

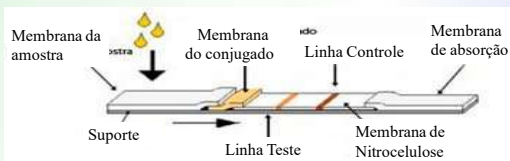
✓ Western Blotting



OBJETIVO

Desenvolvimento de teste rápido para diagnóstico do rotavírus nas fezes utilizando imunoglobulina Y (IgY) de aves imunizadas.

PROTÓTIPO DO TESTE RÁPIDO



Demonstração de uma fita do teste de imunocromatografia de fluxo lateral, evidenciando as posições de cada membrana. (Adaptado de Wong *et al.*, 2009).

Após, serão avaliadas as variáveis do teste, tais como, concentração da IgY anti-RV, tampões de uso, a conjugação de ouro coloidal ao anticorpo conjugado (IgY anti-RV), concentração do anticorpo conjugado, para padronização das condições ideais de funcionamento do teste. As fezes serão aplicadas ao teste após serem diluídas à 10% em tampão da amostra.

METODOLOGIA

- o Conjugação com ouro coloidal ou bead- O anticorpo conjugado utilizado será a própria IgY anti-rotavírus marcado com ouro coloidal ou bead, em concentrações previamente estabelecidas conforme protocolo para os testes rápidos de Bio-Manguinhos/Fiocruz. O preparo das nanopartículas de ouro coloidal será realizado de acordo com o protocolo de Frens (1973) com pequenas modificações.
- o A impregnação das membranas será realizada de maneira similar a todos os kits de teste rápido produzidos por Bio-Manguinhos/Fiocruz, e trata-se de um procedimento confidencial interno, por isso maiores detalhes não serão descritos. As membranas serão preparadas de forma a constituir uma plataforma mediante teste com a combinação de diferentes volumes de impregnação, composições do tampão de corrida e porosidades de membranas de nitrocelulose, além da linha controle que será avaliada se o teste performará melhor com o rotavírus bruto ou proteínas desnaturadas do mesmo.

Avaliação do teste perante a um painel de amostras

- o As amostras serão utilizadas como controle e determinação dos parâmetros estatísticos do teste, tais como, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN).
- o Estas amostras que formarão o painel serão provenientes do Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/Fiocruz, que é Referência Regional em Rotavíruses, e são caracterizadas por meio do ELISA Premier® Rotaclone, e pelo método da reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

Amostras	Número de amostras
Positivas para rotavírus	120
Negativas para rotavírus e outras gastroenterites	60
Negativas para rotavírus e positivas para parainfluenza	30
Negativas para rotavírus e positivas para astrovírus	15
Negativas para rotavírus e positivas para paradenovírus	15

RESULTADOS E CONCLUSÕES

- o Alguns testes com a *bead* foram realizados com sucesso, porém começaram a falhar pelo tempo de estoque da mesma. Esta foi comprada no início do projeto, há um ano e meio. Logo, uma das possibilidades pensadas é realizar a conjugação por ouro coloidal, que é o padrão utilizado em Bio-Manguinhos para todos os seus testes por imunocromatografia de fluxo lateral. Esta conjugação ainda será realizada. Iremos utilizar como base as mesmas condições de variáveis que conseguimos alcançar bons resultados no início da padronização.

Testes com resultados positivos com a *beads*

- Teste de padronização - Neste teste utilizamos as seguintes condições (em negrito os melhores resultados).

Membrana Nitrocelulose	Impregnação IgY anti-RV	Diluição fezes	Tampão	Conjugado
10 µm	40 ng/mm	1:10	TCT 0,025%	0,15 µL/mm (75 ng/mm)
-	-	1:20	-	0,20 µL/mm
-	-	1:25	-	-



Conclusão: O protótipo foi alcançado nas seguintes condições: na linha teste 40 ng/mm de IgY anti-RV; na linha controle 70 ng/mm de rotavírus íntegro; na membrana de conjugado 75 ng/mm (0,15 µL/mm); diluição da amostra de fezes de 1:20 em Tampão Tris Triton 0,025% de caseína; e 10 µm de porosidade da membrana de reação.

Testes de resultados negativos com a *beads*

- Teste de padronização - Neste teste utilizamos a condição das variáveis que achamos melhor, e testamos amostras com concentrações de rotavírus diferentes, inclusive amostras negativas.

Membrana Nitrocelulose	Impregnação IgY anti-RV	Diluição fezes	Tampão	Conjugado
10 µm	40 ng/mm	1:20	TCT 0,025%	0,15 µL/mm (75 ng/mm)



Conclusão: Como pôde ser visto, mesmo nas amostras positivas o teste não ficou satisfatório. A única amostra que apresentou leve marcação positiva foi a 29504. Nas outras, nada ficou marcado ou a membrana ficou com muito *background* das fezes.

PERSPECTIVAS A SEREM DESENVOLVIDAS

- * Conjugação da IgY com ouro coloidal
- * Impregnação das membranas e preparo do cassette
- * Padronização das condições ideais para funcionamento do teste.
- * Análise dos resultados
- * Pesquisa bibliográfica
- * Redação do artigo científico