

## DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE ELISA PARA A DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS A PARTIR DE MATERIAL FECAL

**F. Gregori, P.E. Brandão, C.A.R. Rosales, A. Cortez,  
M.B. Heinemann, L.J. Richtzenhain, J.A. Jerez**

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

### RESUMO

Um método de ELISA policlonal tipo “duplo-sanduiche” foi desenvolvido para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. A amostra NCDV de rotavírus do sorogrupo A foi concentrada por ultracentrifugação utilizando-se um colchão de sacarose a 45% (v/v), e inoculada em coelhos e carneiros. Em seguida, a fração IgG oriunda dos soros dos animais foi purificada por cromatografia de troca iônica e absorvida, utilizando-se polímero de glutaraldeído, de modo a eliminar reações inespecíficas. A presença dos rotavírus foi detectada pela IgG de carneiro e revelada pela IgG de coelho, usando-se IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase. Aplicado a um painel constituído de 86 amostras fecais diarréicas de leitões obteve-se 100% de sensibilidade; 98,79% de especificidade, com uma concordância de 98,83%, tendo como prova padrão a eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE). As variâncias entre 86 repetições da mesma amostra foram 0,001 (para a amostra positiva) e 0,0002 (para a amostra negativa). Estes resultados demonstram que este ELISA constitui-se numa alternativa sensível e específica para o diagnóstico de rotavírus a partir de material fecal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Rotavírus, diarreia, PAGE, ELISA.

### ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN ELISA METHOD FOR DETECTION OF ROTAVIRUS FROM STOOL SPECIMENS. There was developed a polyclonal “double-sandwich” antibody ELISA method for detection of rotavirus from stool specimens. The NCDV strain of rotavirus group A was concentrated by ultra-centrifugation using a 45% (v/v) saccharose cushion and inoculated in rabbits and sheep. After that, the IgG of serum samples of the animals was purified by ion-exchange chromatography and absorbed with whole serum of both animal species using a glutaraldehyde polymer, in order to eliminate unspecific reactions. The presence of rotavirus was detected by the sheep’s IgG and revealed by the rabbit’s IgG, using an anti-rabbit IgG peroxidase conjugate developed in goats. When applied in population of 86 fecal samples from piglets with diarrhea, the results of the ELISA were: 100% of sensitivity; 98.79% of specificity, with an agreement of 98.83%, using as standard the polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) test. The variances between 86 repetitions of the same sample were 0.001 (for one positive sample) and 0.0002 (for one negative sample). These results showed that this ELISA is a sensitive and specific alternative test for rotavirus diagnosis from fecal material.

**KEY WORDS:** Rotavirus, diarrhea, PAGE, ELISA.

### INTRODUÇÃO

As diarreias em animais representam uma das principais causas de morbi-mortalidade do período neonatal (SCHUDEL *et al.*, 1985), caracterizada como uma síndrome de grande complexidade etiológica, que conta com a influência de alterações ambientais, manejo, fatores nutricionais e fisiológicos, os quais cooperam para o agravamento dos quadros (SNODGRASS *et al.*, 1986).

Dentre os agentes virais causadores de diarreias em animais jovens de várias espécies, os rotavírus do sorogrupo A são identificados mundialmente, assumindo particular importância em termos de seu potencial zoonótico e prevalência (ESTES, 1996), tendo sido descritos no Brasil em diversas propriedades de criação de bovinos e suínos (ALFIERI *et al.*, 1994; BUZINARO & JEREZ, 1998; GATTI *et al.*, 1989; JEREZ *et al.*, 1989; LANGONI, 1988).

Para o controle das rotaviroses é primordial a identificação precisa do agente em surtos de diarreia

de modo a se estabelecerem medidas profiláticas direcionadas e, nesse sentido, foi desenvolvido um método de ELISA policlonal tipo “duplo-sanduíche” para o diagnóstico direto de rotavírus do grupo A, a partir de material fecal, utilizando-se IgG de carneiro anti-rotavírus como anticorpo de captura, IgG de coelho anti-rotavírus como anticorpo revelador, e IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugada à peroxidase.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se a amostra NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus) de rotavírus bovino do grupo A, sendo propagada em células de linhagem MA-104, e concentrada por ultracentrifugação (ultracentrífuga Beckman<sup>®</sup> L8-70M) a 100.000 g por 3 horas, utilizando-se um “colchão” de sacarose a 45% (p/v) em tampão TRIS 0,1M/CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM pH 7,3.

Para o preparo do anticorpo de captura, 2 carneiros foram inoculados 4 vezes com intervalo de 21 dias entre cada inoculação pela via subcutânea, utilizando-se 100 µg de NCDV concentrado e adjuvante Avridine<sup>®</sup>, na proporção de 1 parte de adjuvante para 17 partes de antígeno (v/v). Para o preparo do anticorpo revelador, foram inoculados 4 coelhos, em procedimento semelhante ao dos carneiros, mas cada um recebendo 50µg de NCDV concentrado por inoculação. Posteriormente, colheu-se o sangue dos animais e elaboraram-se “pools” para a precipitação da fração gamaglobulínica do soro hiperimune com sulfato de amônio (HERBERT *et al.*, 1973). As frações IgG foram purificadas por cromatografia de troca iônica à base de DEAE-celulose (CORTIER *et al.*, 1984). Visando assegurar a especificidade dos anticorpos de captura e revelador, eles foram absorvidos, respectivamente, com polímeros produzidos com glutaraldeído utilizando-se soro total de coelho e soro total de carneiro, segundo técnica descrita por TERNYNCK & AVRAMEAS (1976), e avaliando-se os resultados por 3 ensaios de ELISA tipo “duplo sanduíche”, utilizando-se microplacas (Nunc Maxisorp<sup>®</sup>) sensibilizadas com 10 µg/mL de anticorpo de captura, frente ao anticorpo revelador diluído a 1:100, conjugado (Sigma Imunochemicals<sup>®</sup> A-6154) diluído a 1:1000, e leitura utilizando-se filtro de 492 nm.

As amostras fecais diarréicas de leitões foram testadas quanto à presença de rotavírus segundo a prova de eletroforese em gel de poliacrilamida-PAGE (HERRING *et al.*, 1982). Na fase inicial de padronização do ELISA foi realizada a titulação em bloco dos reagentes e amostras fecais (13 positivas e 13 negativas) visando determinar as suas diluições de uso. Adotou-se a combinação de reagentes que produziu maior valor de absorvância para as amostras positivas e também a maior diferença entre as médias das

absorvâncias das amostras positivas e negativas. Com base nesta combinação, a média das absorvâncias das amostras positivas foi subtraída de 2 desvios-padrão e os valores superiores ou iguais a este foram considerados positivos.

O ELISA foi então aplicado a um painel constituído por 86 amostras fecais diarréicas de leitões. Foram feitas suspensões a 10% em PBS 0,01M pH 7,4 das amostras fecais, posteriormente clarificadas por centrifugação a 2.000 g por 15 minutos a 4°C. O tampão empregado na diluição das amostras fecais, do anticorpo revelador e do conjugado consistiu em PBS 0,01M pH 7,2/Tween 80 a 0,5% / leite em pó desnatado a 5%. A cada passo da reação de ELISA foram efetuadas 3 lavagens das microplacas com tampão PBS 0,01M pH 7,2/Tween 80 a 0,5%.

As microplacas foram sensibilizadas com anticorpo de captura em concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6, em volume de 100µL por cavidade e mantidas em incubação a 4°C por 18 h. Em seguida, foram bloqueadas com tampão carbonato-bicarbonato 0,05M, pH 9,6 com 10% de leite em pó desnatado, sendo incubadas a 4°C por 1 hora. Adicionou-se cada amostra fecal tratada diluída a 1:4 (v/v), em duplicata, incubando-se a 37°C por 1 hora. O anticorpo revelador foi diluído a 1:100 (v/v) e utilizado em volume de 100 µl por cavidade. Após incubação a 37 °C por 1 hora, adicionou-se o conjugado na diluição de 1:1000 (v/v) diluído em tampão de diluição, em volume de 100 µL por cavidade e incubaram-se as placas a 37°C por 1 hora. Empregou-se a ortofenilenodiamina (OPD) como solução cromógena, em tampão citrato-fosfato pH 5,0, acrescida de 0,012% de peróxido de hidrogênio. Decorridos 10 minutos após a adição do substrato, adicionou-se a solução de bloqueio, HCl 1N, em volume de 50µL por cavidade.

As placas foram lidas em aparelho leitor de placas Labysystem<sup>®</sup> modelo Multiskan plus, com filtro de 492 nm. Os valores de absorvância obtidos foram expressos pela média aritmética entre a duplicata de cada amostra, e calcularam-se os valores de sensibilidade, especificidade e concordância relativas. Visando avaliar a reprodutibilidade do ELISA, selecionou-se ao acaso duas amostras fecais, sendo uma positiva e outra negativa para rotavírus pela técnica de PAGE. Cada amostra foi testada por 86 vezes distribuídas em 2 placas diferentes, de modo a se estabelecer a variância entre as repetições.

## RESULTADOS

No ensaio de ELISA visando verificar a presença de reatividade entre os anticorpos captura e revelador, sem que estes tivessem sido absorvidos frente aos seus

respectivos polímeros, observou-se uma densidade óptica de 1,179; posteriormente, ao se absorver apenas o anticorpo de captura, houve uma redução para o valor de 0,380 e, ao se absorverem ambos os anticorpos, foi possível reduzir este valor a 0,053, permitindo, assim, o emprego dos anticorpos captura e revelador elaborados anteriormente.

Os valores médios de densidades ópticas obtidas com o ensaio de ELISA na etapa de padronização encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1- Valores médios de densidades ópticas obtidas com o ensaio de ELISA tipo “duplo sanduíche” utilizando amostras fecais negativas e positivas ao PAGE, frente a diversas diluições do anticorpo revelador e sensibilização da placa com 10 µg/mL do anticorpo de captura. Leitura realizada com filtro de 492 nm, São Paulo, 1998.

Revelador	Amostras positivas		Amostras negativas	
	1:4	1:12	1:4	1:12
“1:100”	0,587	0,479	0,046	0,041
“1:200”	0,459	0,381	0,036	0,040
“1:400”	0,371	0,315	0,077	0,071
“1:800”	0,227	0,183	0,028	0,027
“1:1600”	0,166	0,147	0,029	0,046

Em função de tais resultados, adotou-se nas etapas subsequentes a concentração do anticorpo de captura de 10 µg/mL, diluição da amostra fecal de 1:4, e diluição de anticorpo revelador de 1:100. Com base na combinação escolhida dos reagentes, a padronização apresentou média aritmética das densidades ópticas entre todas as amostras positivas de 0,587 e desvio padrão de 0,158. Logo, as amostras que apresentaram valor maior ou igual a 0,271 foram consideradas como sendo positivas.

Na Tabela 2 é apresentada a classificação das amostras fecais testadas com a prova de ELISA “duplo sanduíche”, tomando como referência a prova de PAGE. Neste sentido, obteve-se uma sensibilidade relativa do ELISA de 100%; especificidade relativa de 98,79%; e concordância relativa de 98,83%.

Tabela 2 - Classificação das amostras fecais segundo a prova de ELISA “duplo sanduíche”, tendo como referência a prova de eletroforese em gel de poliacrilamida, São Paulo, 1998.

ELISA	PAGE		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	3	1	4
Negativo	0	82	82
Total	3	83	86

A avaliação da reprodutibilidade de 86 repetições de uma amostra positiva e 86 repetições de uma amostra negativa, segundo a prova de ELISA “duplo sanduíche”, apresentou média das densidades ópticas de 0,483 e 0,077 e desvio padrão de 0,036 e 0,016, respectivamente, para a amostra positiva e negativa. A variância foi de 0,001 para a amostra positiva e de 0,0002 para a negativa.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Vários testes têm sido empregados no diagnóstico dos rotavírus, incluindo PAGE (HERRING *et al.*, 1982), ELISA (YOLKEN *et al.*, 1978; ELLENS & LEEUW, 1977; BELLAMY *et al.*, 1983; PEREIRA *et al.*, 1985) e a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (GOUVEA *et al.*, 1990).

Como qualquer outra reação sorológica, na reação de ELISA há uma dependência direta da qualidade dos anticorpos empregados. Foi possível a utilização dos anticorpos de captura e revelador, produzidos a partir de soro de animais inoculados com o vírus concentrado apenas em colchão de sacarose, sem a necessidade de purificá-los com gradiente de cloreto de cério como descrito anteriormente por PEREIRA *et al.* (1985).

Uma das limitações na elaboração de um ELISA é a presença freqüente de ruídos e reações inespecíficas (CROWTHER, 1995). Através do emprego de polímeros de proteínas insolúveis como imunoadsorventes, à base de glutaraldeído, reduziu-se substancialmente a intensidade de reações inespecíficas entre os anticorpos de captura e revelador, o que assegurou sua especificidade restrita aos rotavírus. Tal fato torna-se particularmente relevante no ELISA tipo “duplo-sanduíche”, pois, além da possível interação entre os anticorpos captura, revelador e conjugado como pudemos observar, o uso de fezes como amostra, dada a sua composição diversa, pode potencialmente proporcionar o aparecimento de tais reações.

O ponto de corte adotado implicou valores de sensibilidade relativa de 100%; especificidade relativa de 98,79% e concordância de 98,83%, quando comparada à PAGE. Os valores de variabilidade, dados em função das variâncias apresentadas, foram 0,1% para a amostra positiva e 0,02% para a amostra negativa e, portanto, este componente não influenciou substancialmente nos resultados de leituras entre placas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFIERI, A.; ALFIERI, A.F.; FREITAS, J.C.; SILVA, C.A.; FREIRE, R.L.; ARROS, A.R.; BARREIROS, M.A.B.; MULLER, E.E. Ocorrência de *E. coli*, Rotavírus, Picobirnavírus e *Cryptosporidium* em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. *SEMINA (Ciências Agrárias)*, v.15, n.3, p.5-7, 1994.

- BELLAMY, K.; GARDNER, P.S.; HAMBLING, M.H.; RICE, S.; BRADBURN, A.F. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human rotavirus in stools. *J. Virol. Methods*, v. 7, p. 65-72, 1983.
- BUZINARO, M. G. & JEREZ, J.A. Caracterização eletroforética de rotavírus em rebanhos leiteiros na região nordeste do Estado de São Paulo. *Ars Veterinária*, v. 14, n. 2, p.193-200, 1998.
- CORTHER, G.; BOSCHETTI, E.; CHARLEY-POULAIN, J. Improved method for the IgG purification from various animals species by ion exchange chromatography. *J. Immunol. Methods*, v.66, p.75-79, 1984.
- CROWTHER, J.R. ELISA: theory and practice. Totowa: Humana Press, 1995.
- ELLENS, D.J. & DELEEUW, P.W. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. *J. Clin. Microbiol.*, v. 6, n.5, p.530-532, 1977.
- ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, P.M.; HOWLEY, P.M. Field's Virology. 3.ed., Philadelphia: Linpcoot-Raven Publishers, 1996. 1625p.
- GATTI, S.M.V.; HARA, N.H.; FERRAZ, M.M.G.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Presence of group A and non-A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, SP, Brazil. *Med. Microbiol. Immunol.*, v.178, p.347-349, 1989.
- GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUSHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polimerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, n.2, p. 276-282, 1990.
- HERBERT, G.A.; PELHAM, P.L.; PITTMAN, B. Determination of the optimal ammonium sulphate concentration for the fractionation of rabbit, sheep, horse and goat antisera. *Appl. Microbiol.*, v.25, p.26-36, 1973.
- HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, n.3, p.473-477, 1982.
- JEREZ, J.A.; CANDEIAS, J.A.N.; DURIGON, E.L.; RÁCZ, M.L. Tipos eletroforéticos de rotavírus bovino. *Rev. Microbiol.*, v.20, n.2, p.254-257, 1989.
- LANGONI, H. Isolamento e teste de placas para uma amostra de rotavírus bovino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.40, n.3, p.225-230, 1988.
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; ANDRADE, Z.P.; DE CASTRO, L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J. Virol. Methods*, v.10, p.21-28, 1985.
- SCHUDEL, A.A.; PASINI, M.I.; BARRENDEGUY, M.E.; CORNAGLIA, E.; GOTTSCHALK, M.; YAFAL, A.G.; FITAMAN, N.; GRODSINSKY, C.; SOZZI, M. *Manual de técnicas para la identificación de agentes infecciosos asociados a diarreas neonatales bovinas*. Castelar, FAO - Red. de Cooperation - Laboratorios Veterinarios de Diagnóstico, 1985.75 p.
- SNODGRASS, D.R.; TERZOLO, H.R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J.D.; SYNGE, B.A. A etiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.*, v. 119, p. 31-34, 1986.
- TERNYNCK, T. & AVRAMEAS, S. Polymerization and immobilization of proteins using ethylchloroformate and glutaraldehyde. *Sc. J. Immunol. Suppl.*, v.3, p. 29-35, 1976.
- YOLKEN, R.H.; BARBOUR, B.; WYATT, R.G.; KALICA, A.R.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of rotaviruses from different animals species. *Science*, v. 201, p. 259-261, 1978.

Recebido para publicação em 26/5/00