



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

WALDEMIR DE CASTRO SILVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE
ROTAVÍRUS: IMUNOENSAIO DE CAPTURA E AGLUTINAÇÃO EM
LÁTEX**

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

RIO DE JANEIRO

2005

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos e nos laboratórios de Biodevices Ltda., sob orientação da Profa. Dra. Jussara Pereira do Nascimento e Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite.



INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO PROFISSIONAL EM TECNOLOGIA DE IMUNOBIOLOGICOS

WALDEMIR DE CASTRO SILVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DE
ROTAVÍRUS: IMUNOENSAIO DE CAPTURA E AGLUTINAÇÃO EM
LÁTEX**

ORIENTADORES: Profa. Dra. Jussara Pereira do Nascimento
Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite

Aprovada em: 25/07/2005

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Myrna Cristina Bonaldo – Presidente
Profa. Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia
Profa. Dra. Maria da Glória Martins Teixeira

Rio de Janeiro, 25 de julho de 2005

S587 Silveira, Waldemir de Castro

Desenvolvimento de teste rápido para detecção de rotavírus: imunensaio de captura e aglutinação em látex / Waldemir de Castro Silveira. - Rio de Janeiro, 2005. iv, 61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2005.

Bibliografia: p. 48-61.

1. Rotavírus. 2. Imunensaio. 3. Aglutinação
4. Látex. 5. Diarréia. 6. Diagnóstico. I. Título

CDD: 579.254

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Jussara Pereira do Nascimento pelos ensinamentos, dedicação e paciência no decorrer da execução desse projeto.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite pelos ensinamentos, paciência e amizade no decorrer da execução desse projeto.

A relatora da minha dissertação Profa. Dra. Rita de Cássia Nasser Cubel Garcia pelo empenho e orientações durante a revisão deste projeto.

A coordenação e aos professores do Curso de Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos.

ÍNDICE ANALÍTICO

| | |
|-------------------------------------|-----|
| RESUMO | ii |
| ABSTRACT | iii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | iv |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 19 |
| 3. OBJETIVOS | 20 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 21 |
| 5. RESULTADOS | 32 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 40 |
| 7. CONCLUSÕES | 46 |
| 8. PERSPECTIVAS FUTURAS | 47 |
| 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |

RESUMO

O rotavírus humano (RV) pode ser detectado prontamente pelo método de aglutinação do látex (LTE), com elevada sensibilidade e especificidade, através da reação cruzada com o anticorpo anti-rotavírus de carneiro. As partículas de látex revestidas com a imunoglobulina G anti-rotavírus, são especificamente aglutinadas na presença do RV, com resultados macroscopicamente evidentes dentro de poucos minutos. Para a sensibilidade e a especificidade do método de LTE proposto, comparou-se com outro método similar (Rota-Kit Slidex®; BioMérieux), um total de 81 amostras fecais de crianças até 5 anos com gastroenterite aguda. Com 36 amostras diarréicas RV-positivos e 45 RV-negativos, a sensibilidade analítica do teste de LTE proposto foi > 99,99%, e a especificidade analítica também foi > 99,99%. O LTE demonstrou ser capaz de detectar partículas de rotavírus em fezes diarréicas em concentrações 20 vezes menores que o limite de detecção do Rota-Kit Slidex®. A frequência de testes positivos de LTE pareceu ser proporcional à concentração de viriões na amostra fecal. O LTE demonstrou uma sensibilidade de 94,0% (34 de 36 positivos), e uma especificidade > 99,99% (45 de 45 negativas) quando comparado com o Rotazyme II®, um ensaio imunoenzimático (Abbott Laboratories). O método do LTE é rápido, facilmente utilizável para detectar o RV em amostra fecal de crianças e é apropriado para a aplicação como um teste diagnóstico simples, principalmente para triagem de grandes grupos de pacientes. O LTE é estável por pelo menos 2 anos se armazenado sob refrigeração (4°C) e se mostra útil para laboratórios de pequeno porte, para rotinas ambulatoriais, de emergências e de triagem e finalmente, para discriminar amostras negativas que poderão então ser testadas por testes mais sensíveis.

ABSTRACT

Human rotavirus (HRV) can readily be detected by the latex agglutination assay method (LTE), with raised sensitivity and specificity, based on crossed reaction with the anti-rotavirus sheep antibody. The latex particles coated with anti-rotavirus immunoglobulin G, agglutinates specifically when in contact with HRV in few minutes, with evident macroscopically results. The sensitivity and the specificity performance of the proposed method (LTE), was compared with another similar method (Rota-Kit Slidex®, BioMérieux), a total of 81 specimens from children with acute gastroenteritis were tested. With 36 HRV positive samples and 45 HRV negative samples, the analytical sensitivity of LTE was better than 99,99% and the analytical specificity, also, was better than 99,99%. The LTE demonstrated to be capable to detect particles of HRV in fecal samples in concentrations 20 lesser times that the limit of detection of Rota-Kit Slidex®. The frequency of positive tests of LTE seemed to be proportional to the concentration of virions in the fecal sample. The LTE demonstrated a sensitivity of 94,0% (34 of 36 positives), and a specificity >99,99% (45 of 45 negatives) when compared with Rotazyme II® (Abbott Laboratories). The method of the LTE is fast and easily usable to detect HRV in children fecal sample and is appropriate for application as a test of simple diagnosis, mainly for screening of great groups of patients. The LTE is stable per at least 2 years if stored under refrigeration (4°C) and it shows useful for small laboratories, clinic routines, emergence rooms and screenings and finally to discriminate negative samples that could then be tested by more sensible tests.

LISTA DE ABREVIATURAS

%= por cento

μg = micrograma

μL = microlitro

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

et al.= e colaboradores

ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay

g = aceleração da gravidade terrestre ($9,8 \text{ m/s}^2$)

Kg = quilograma

M = molar

mg = miligrama

mL = mililitro

ρ/v = peso/volume

pH =concentração de hidrogênio iônico

q.s.p.= quantidade suficiente para

v/v = volume/volume

®= marca registrada

LTE= Látex teste-desenvolvimento

1. INTRODUÇÃO

1.1 Micro-esferas de Látex

O primeiro método de imunoenensaio baseado na aglutinação em látex descrito foi um teste para detecção do fator reumatóide por Singer & Plotz (1956). Posteriormente, surgiram novas aplicações e tecnologias com base em partículas de látex como plataforma para amplificação do sinal das reações antígeno-anticorpo e vem sendo empregadas em uma crescente gama de técnicas analíticas novas para diagnóstico de infecções microbianas, doenças autoimunes, dosagem de hormônios, drogas e proteínas do soro (Molina-Bolivar & Galisteo-González, 2005).

O aperfeiçoamento na detecção da aglutinação e os novos materiais introduzidos mantêm esta elegante tecnologia no topo das aplicações analíticas em diversos setores como, laboratórios clínicos, de toxicologia, de biologia molecular, controle de produtos farmacêuticos, controles ambientais, etc. (Gribnau et al. 1986; Tijssen & Adam, 1991; Ellis & Sobanski, 2000; Andreotti et al. 2003).

A detecção instrumental da aglutinação das partículas usando espectrofotômetros, nefelômetros, fluorômetros e contadores automáticos de partículas, que medem a absorção ou dispersão da luz, no lugar do olho humano, tornou possível desenvolver imunoenensaos muito mais sensíveis e precisos, capazes de medir qualitativamente e quantitativamente diversos analitos com sensibilidade de poucos picogramas (Bangs, 1990; Molina-Bolivar & Galisteo-González 2005).

Os testes de aglutinação em látex são muito populares em laboratórios clínicos. Estes testes já foram aplicados à detecção de mais de 100 doenças infecciosas diferentes, tendo como exemplos recentes: malária, doença de Lyme, síndrome respiratória aguda grave, tuberculose, hepatite C, dengue, e

muitas outras aplicações estão atualmente surgindo (Molina-Bolivar & Galisteo-González, 2005).

Na técnica de aglutinação básica, quando uma amostra que contem o antígeno específico (ou o anticorpo) é misturada com o látex sensibilizado e de aparência leitosa, ocorrerá uma aglutinação visível (Figura 1). O grau de aglutinação será em função da concentração do aglutinante e do aglutinado. As partículas do látex são usadas para permitir a visualização da formação do complexo do antígeno-anticorpo (Bangs, 1990).

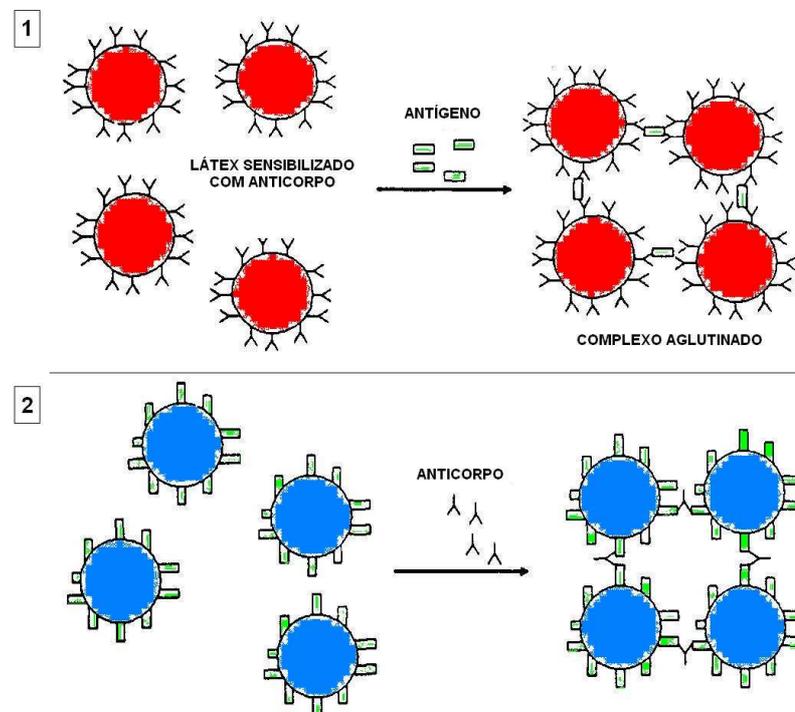


Figura 1 - Diagrama da aglutinação em látex. Reação entre látex sensibilizado com anticorpo (1) e antígeno na amostra e entre látex sensibilizado com antígeno e anticorpo na amostra (2).

Muitos dos testes de aglutinação em látex disponíveis são executados manualmente e a aglutinação é detectada pela observação visual da formação de grumos. O desenvolvimento desses grumos, medindo cerca de 50 μm cada para partículas de látex com 0,8 μm de diâmetro, se torna visível a olho nu,

quando um mínimo de 100 grumos se forma no campo de observação (Figura 2). Esses por sua vez requerem para sua formação, pelo menos 100.000 partículas de látex, com aproximadamente 10 ligações por partícula (Bangs, 1990).

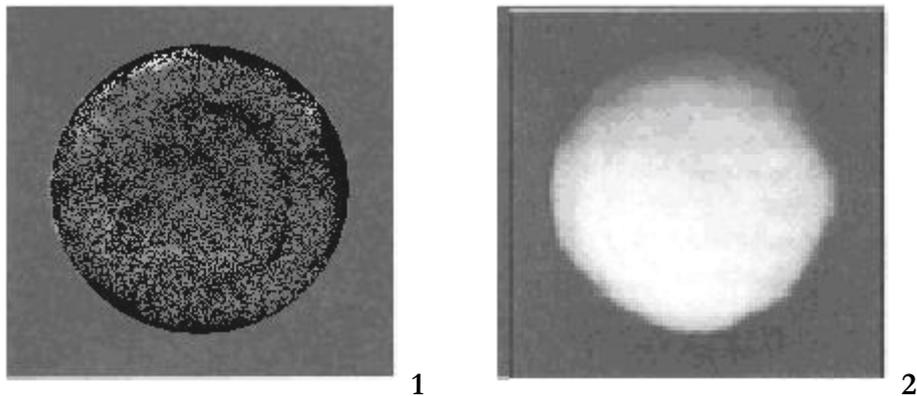


Figura 2 – Visualização da aglutinação em látex. Aglutinação das partículas de látex após reação antígeno-anticorpo em um teste em lâmina. Reação positiva com formação de grumos (1) e reação negativa sem formação de grumos com a manutenção da suspensão de aspecto leitoso (2).

As partículas de látex são preparadas geralmente por polimerização emulsiva (Yanase et al. 2003). O estireno é misturado a uma solução de detergente, como por exemplo, o dodecil-sulfato de sódio, sob agitação, resultando na emulsificação de bilhões de micelas extremamente uniformes no diâmetro. Em seguida, é adicionado um iniciador da polimerização solúvel na água, tal como o persulfato de potássio, sob condições de agitação e temperatura controladas, provocando-se o “endurecimento” das micelas ou polimerização. Quando a polimerização é terminada, as cadeias do poliestireno estarão arrançadas nas micelas com o esqueleto de hidrocarboneto no centro e os íons terminais de sulfato na superfície da esfera, expostos à fase aquosa (Figura 3).

Outros hidrocarbonetos e derivados foram usados também para produzir partículas esféricas uniformes, tais como: tolueno de vinil-estireno, tolueno polivinílico, estireno-divinil-benzeno, metacrilato de polimetila, e outros (Ortega-Vinuesa et al. 1995; Miraballes-Martínez et al. 1996; Miraballes-Martínez et al. 1997; Molina-Bolívar et al. 1998; Izquierdo et al. 2004).

O termo látex é amplamente utilizado para estas micro-esferas poliméricas, porque a emulsão resultante do processo de síntese destas partículas apresenta uma aparência leitosa parecida com o látex extraído da seringueira.

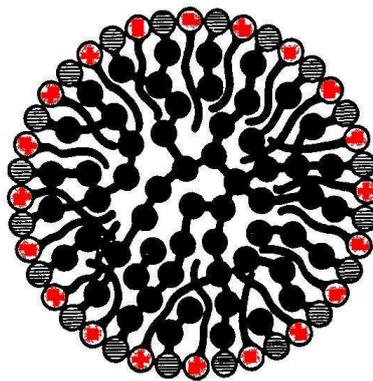


Figura 3 – Diagrama de uma partícula de látex. As cadeias de hidrocarbonetos são representadas pelas caudas das esferas pretas (radicais sulfatos livres) e as esferas vermelhas caudadas representam o detergente

As partículas de látex podem ser configuradas para um diâmetro desejado modificando-se o hidrocarboneto, o detergente, o iniciador e o processo da preparação (Yanase et al. 2003). O tamanho das partículas disponíveis no mercado, variam de 0,005 μm a 10 μm de diâmetro (Figura 4). As partículas de látex estão também disponíveis em uma variedade de cores para facilitar a leitura visual ou instrumental.

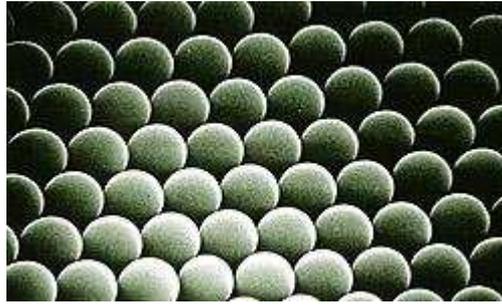


Figura 4 – Fotomicrografia das micro-esferas de látex. Partículas de látex com 0.8 μm de diâmetro, em suspensão uniforme, obtida por microscopia eletrônica em amplificação de 10.000 vezes (Bangs, 1990).

As partículas de látex têm uma carga superficial negativa devido à presença de grupos sulfato e sulfonato que permitem mantê-las sob a forma de suspensões estáveis. As partículas podem também ter suas superfícies tratadas com a adição de grupos funcionais para facilitar o acoplamento de proteínas e outras moléculas e para aumentar a sua estabilidade. Os tratamentos funcionais incluem a carboxilação, amidação, aminação, hidroxilação e mesmo a magnetização (Ortega-Vinuesa et al. 1995; Miraballes-Martínez et al. 1996; Miraballes-Martínez et al. 1997; Molina-Bolivar et al. 1998; Ortega-Vinuesa & Bastos-Gonzalez 2001; Yanase et al. 2003; Izquierdo et al. 2004).

O método mais simples de unir proteínas às partículas é pela adsorção passiva, favorecida pelas interações hidrofóbicas entre a superfície da partícula de látex e aquelas da estrutura externa da molécula protéica. O látex e as proteínas são misturados em uma solução tampão apropriada, são incubados a uma determinada temperatura até que ocorra a adsorção e em seguida lava-se diversas vezes até que o látex agora sensibilizado esteja livre de material residual não adsorvido (Dezelic, 1971a; b; Hidalgo-Álvarez & Galisteo-González, 1995; Miraballes-Martínez et al. 1996; Ortega-Vinuesa & Bastos-Gonzalez, 2001).

O problema principal da adsorção passiva é que as proteínas podem dissociar gradualmente das partículas, modificando as características da

aglutinação do látex sensibilizado com o tempo. Também, algumas moléculas não adsorvem nas partículas do látex ou adsorvem de tal maneira que ficam inacessíveis (Hidalgo-Álvarez & Galisteo-González, 1995). Estes problemas são superados geralmente por estratégias de estabilização com soluções tamponadas, com detergentes apropriados ou acoplando-se covalentemente as moléculas à superfície da partícula. Em geral é necessário utilizar um reagente bifuncional como o glutaraldeído ou as carbodiimidas, entre outros, para permitir a ligação ativamente. Ainda pode ser útil a adição de uma cadeia curta de hidrocarboneto (espaçador) que forneça um enlace flexível dos ligantes à superfície (Ortega-Vinuesa & Bastos-González, 1995; Miraballes-Martínez et al. 1996).

Alguns pontos importantes têm que ser considerados em todo o procedimento de sensibilização das partículas de látex (Hidalgo-Álvarez et al. 1995; Ortega-Vinuesa et al. 1995; Miraballes-Martínez et al. 1996):

- O ligante deve ser tão puro quanto possível. As impurezas reduzem a sensibilidade e a especificidade do teste, uma vez que os contaminantes podem competir com a reação desejada.
- A quantidade de ligante unida à superfície das partículas deve ser cuidadosamente controlada. A aglutinação pode diminuir se as partículas não contiverem ligante em quantidade suficiente ou pode ocorrer inespecificamente se estiverem em excesso, pela demasia de interações hidrofóbicas ou mesmo iônicas.
- Ligantes não acoplados devem ser sempre removidos após a sensibilização. Qualquer ligante livre na suspensão de látex interferirá posteriormente no teste, por competição.
- Uma vez que as partículas sejam revestidas, dependendo da molécula acoplada, seu comportamento químico superficial poderá ser diferente e sua estabilidade poderá ser modificada, devido a exposição de estruturas hidrofóbicas, iônicas, ou mesmo pela ocultação dos epítomos de interesse. Assim o pH, a

concentração salina e a presença de emulsificantes e protetores coloidais têm papel importante na elaboração da formulação.

1.2 Os rotavírus e a gastroenterite

1.2.1 Doença diarréica

A doença diarréica é uma das enfermidades infantis mais comuns em todo o mundo. E embora as evidências demonstrem o declínio da mortalidade em países desenvolvidos durante as duas últimas décadas, a diarréia ainda permanece como uma das principais causas de morte em crianças menores de cinco anos de idade em países em desenvolvimento (O'Ryan et al. 2001, Parashar et al. 2003).

Em países desenvolvidos, assim como também no Brasil, sua importância está relacionada ao impacto da doença na população, traduzido pelos danos causados à saúde, afetando o desenvolvimento infantil, bem como à sociedade pelos custos gerados pela demanda aos serviços médicos (custos diretos) e as perdas de dias de trabalhos, de escola, gastos com medicamentos e transportes (custos indiretos) (O'Ryan et al. 2001, Parashar et al. 2003).

A doença diarréica ou gastroenterite é uma síndrome que pode ser causada por diferentes agentes como vírus, bactérias e parasitas. A importância desses agentes está relacionada às condições de saneamento básico e higiene da população. O rotavírus e a *Escherichia coli* enteropatogênica são os patógenos mais comuns nos episódios agudos de diarréias em crianças (O'Ryan et al. 2001, Parashar et al. 2003).

1.2.2 O rotavírus como importante agente das gastroenterites

Os rotavírus (RV) são reconhecidamente os agentes virais mais importantes associados às doenças diarréicas agudas, atingindo humanos e

várias espécies de mamíferos e aves. As infecções por rotavírus são comuns em muitas dessas espécies e muitas vezes podem ocorrer de forma sub-clínica. Os episódios de diarreia podem variar de um quadro leve, com diarreia líquida e duração limitada a quadros graves com febre, vômitos e desidratação. As conseqüências da infecção estão relacionadas à idade e ao grau de nutrição. A infecção pelos RV tem caráter agudo podendo levar à desidratação e ao óbito em poucas horas. Neste caso o diagnóstico rápido e preciso deste vírus é fundamental para a adoção de medidas profiláticas, uma vez que a sintomatologia clínica consiste num quadro diarreico e, portanto, deve haver o diagnóstico diferencial com os demais agentes causadores de gastroenterites (Parashar et al. 2003, O’Ryan et al 2001, Matson et al 2000, WHO 2000).

Embora possam infectar indivíduos de todas as idades, infecções sintomáticas, isto é, as diarreias, geralmente ocorrem em crianças na faixa etária de seis meses a dois anos. Os RV são ainda a principal causa de surtos de diarreia nosocomial, em creches e pré-escolas. Apesar da doença diarreica ocorrer primariamente em crianças, também é comum em jovens e adultos, associada a surtos esporádicos em espaços fechados como escolas, ambientes de trabalho e hospitais (Albert et al. 1999).

Anualmente, estima-se em 130 milhões de casos de diarreia por rotavírus, com cerca de 500 mil mortes de crianças abaixo de cinco anos de idade e dois milhões de hospitalizações, e em pelo menos 5 milhões, o número de mortes que ocorrem em cada ano por diarreia infecciosa, nos países em desenvolvimento (Widdowson et al. 2005; Parashar et al. 2003; WHO 2000).

Os rotavírus, eliminados em grande concentração nas fezes infectadas, são transmitidos pela via fecal-oral, por água, alimentos e objetos contaminados, por pessoa a pessoa e, provavelmente, secreções respiratórias,

mecanismos que permitem a disseminação da doença (van Duynhoven et al. 2005).

Devido ao elevado índice de morbi-mortalidade associada à diarreia por rotavírus, ficou evidente a necessidade de desenvolvimento de vacinas contra esse vírus, cujo objetivo principal é a atenuação da gravidade da doença diarreica. Atualmente existem diferentes vacinas sendo submetidas à ensaios clínicos para avaliação de suas eficácias e segurança (Dennehy et al. 2005, Glass et al. 2005).

O caráter zoonótico dos rotavírus tem sido demonstrado pela ocorrência de sorotipos tipicamente de animais em humanos e vice-versa, ou ainda, pela similaridade da seqüência dos genes que codificam proteínas virais, como observaram Nakagomi et al. (1982), Gusmão et al. (1994), e Li et al. (1994).

Segundo Kapikian & Chanock (2002), a transmissão de rotavírus entre diferentes espécies animais constitui-se num evento raro, ainda que certos rotavírus animais compartilham antígenos neutralizantes com rotavírus humanos e que algumas amostras de rotavírus animais possam infectar humanos.

Para o controle das rotaviroses é primordial a identificação precisa dos agentes envolvidos, de modo a se estabelecerem medidas profiláticas direcionadas. Para tanto, o diagnóstico das infecções por rotavírus baseia-se na detecção das partículas, antígenos ou RNA virais a partir de material fecal, uma vez que o cultivo dos mesmos não se aplica a rotina de laboratórios clínicos (Smith et al. 1993; Hughes 1993; O'Ryan et al. 2001).

1.2.3 Os rotavírus, estrutura e classificação.

Bishop et al. (1973), ao examinar o fluído duodenal de crianças com diarreia por microscopia eletrônica foram as primeiras a identificar partículas

semelhantes a rotavírus humano (figura 5). Desde então o RV tem sido objeto de estudo por diversos pesquisadores em todo mundo, por ser o principal agente causador de gastroenterite infantil. Quase simultaneamente Flewett et al. (1973), identificaram o vírus por método similar no Reino Unido. Flewett et al. (1974), verificaram por microscopia eletrônica que as partículas virais presentes em fezes de crianças com gastroenterites agudas e de bezerros com quadro clínico de diarreia eram morfologicamente indistinguíveis.

O termo rotavírus é derivado da palavra latina “rota”, que significa roda e foi sugerido porque o esboço circular do capsídeo do vírus se assemelha à roda de uma carroça.

Em 1978, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) propõe a criação do gênero *Rotavirus*, dentro da Família *Reoviridae* (Matthews, 1979). A partícula viral completa é esférica, apresentando diâmetros entre 60 e 80 nm. É composta por triplo capsídeo icosaédrico, com 3 camadas protéicas não envelopadas e contendo um genoma de RNA de fita dupla compreendida por 11 segmentos, que codifica proteínas estruturais e não estruturais (Estes, 2002).

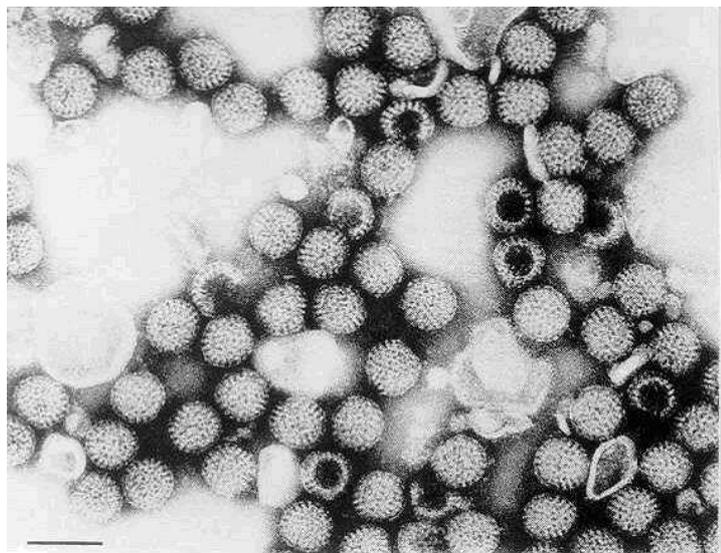


Figura 5 – Fotomicrografia de partículas de rotavírus humano em amostra fecal, obtida por microscopia eletrônica (adaptada de Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG et al: Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. Science 1974; 15:1049).

As principais propriedades antigênicas dos rotavírus, grupo, subgrupo e sorotipo são determinados pelas proteínas virais do capsídeo. O rotavírus tem sete grupos principais (A-G); a maioria das cepas humanas pertencem ao grupo A, embora os grupos B e C sejam associados com a doença humana. O produto do sexto gene do rotavírus do grupo A codifica a VP6, a proteína viral mais abundante, que é a determinante principal da reatividade do grupo, principal alvo dos testes diagnósticos comuns, e contém o antígeno usado para classificar os subgrupos I e II. As proteínas exteriores do capsídeo, VP7, ou proteína G (codificada pelo gene 7, 8, ou 9, dependendo da cepa), e VP4, ou proteína P (codificada pelo segmento 4 do gene), determinam a especificidade do sorotipo e dão forma à base da classificação binária (tipo de G e de P) dos rotavírus (figura 6). As proteínas G e P induzem anticorpos neutralizantes e estão relacionadas à resposta de proteção imune (Estes, 2002).

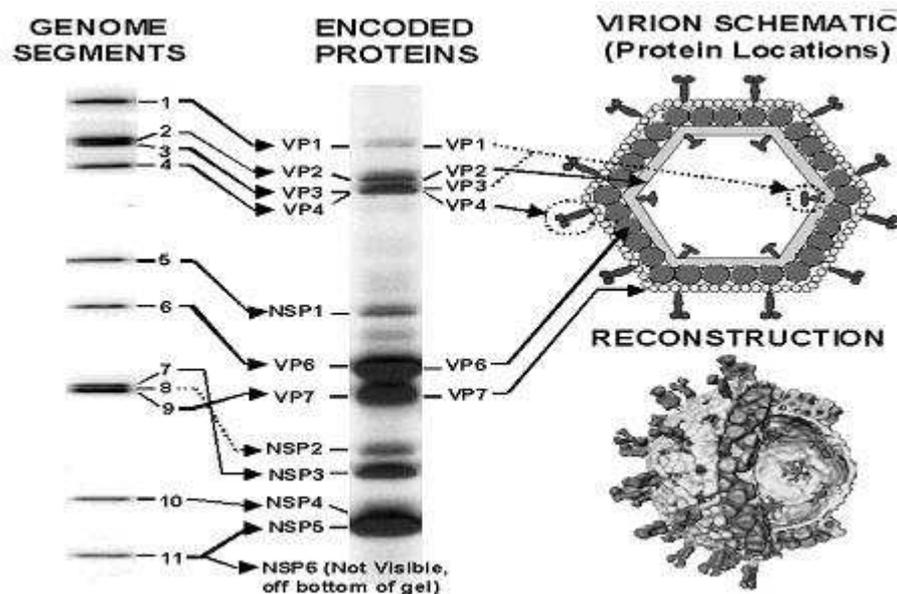


Figura 6 – Estrutura da partícula do rotavírus (SA -11). Localização e mobilidade eletroforética das proteínas estruturais e não estruturais. (adaptada de Córner & Ramig, 1987)

Com o avanço das técnicas de engenharia genética e a disponibilidade de dados da seqüência de vários sorotipos de rotavírus, foram desenvolvidos ensaios moleculares de reação em cadeia pela polimerase (PCR), empregando-

se iniciadores específicos (Xu et al. 1990). Essas técnicas de genotipagem têm gerado importantes informações sobre a epidemiologia molecular dos rotavírus. Até o momento foram identificados 14 tipos G baseados na seqüência de VP7 e 20 tipos P baseados na seqüência de VP4 (Lorrot et al. 2005).

Estudos utilizando diversas técnicas sorológicas, entre elas a imunofluorescência, ensaio imunoenzimático e imuno-microscopia eletrônica, revelaram que os rotavírus possuem um antígeno comum, presente no capsídeo interno da partícula viral, denominado de antígeno de grupo. Até o presente momento foram descritos 7 diferentes grupos: A, B, C, D, E, F, e G sendo que os rotavírus do grupo A são os mais prevalentes (Estes, 2002).

Em ensaios de diagnóstico, o VP6 é o grupo antigênico predominantemente detectado por constituir 51% do virion e ser altamente imunogênico (Kapikian & Chanock, 2002). Assim, embora existam diferenças entre os rotavírus do grupo A, quer em amostras animais ou humanas, a detecção imunológica destes vírus, inclusive pela prova de ELISA, é facilitada pelo fato de todas as amostras conhecidas do grupo A compartilharem epítomos de reatividade cruzada localizados na proteína VP6 (Mattion et al., 1994; Yolken & Wilde, 1994).

1.2.4 Diagnóstico laboratorial da infecção por rotavírus

O diagnóstico das rotavirose é realizado pela detecção direta de vírus nas fezes, dada a elevada prevalência de anticorpos contra os vírus entéricos e pelo fato de não haver associação suficientemente discriminativa entre os títulos séricos de anticorpos e proteção para a enfermidade. Outro fator favorável à detecção direta dos rotavírus nas fezes é a eliminação de um elevado número de partículas virais no início das manifestações clínicas. As fezes dos pacientes que sofrem de gastroenterite aguda por rotavírus podem conter cerca de 10^9 ou mais virions por grama (Bishop et al. 1973; Bishop, 1996).

O diagnóstico laboratorial da infecção por rotavírus é feito através da detecção direta de partículas, antígenos ou RNA viral em amostras fecais, através de diferentes técnicas e reagentes. Assim o vírus pode ser detectado diretamente nas fezes pelos métodos de microscopia eletrônica direta (Flewett et al. 1973; Bishop et al. 1974; Nicolaieff et al. 1980), imuno-microscopia eletrônica (Kimura, 1981; Obert et al. 1981; Svensson et al. 1983), ou por ensaios imunes utilizando anticorpos específicos como, imunofluorescência (Bryden et al. 1977; Rhodes et al. 1979; Grauballe et al. 1981), ensaio imunoenzimático de captura em fase sólida - ELISA (Yolken et al., 1977; Beards & Bryden, 1981; Obert et al. 1981; 1984; Rubenstein & Miller, 1982; Beards et al. 1984), imunodifusão radial (Sharp & Littlejohns, 1981; Pinto et al. 1993), fixação de complemento (Kapikian et al. 1975; Clementi et al. 1981), hemaglutinação passiva reversa (Sanekata et al. 1979), radioimuno ensaio (Kalica et al. 1977; Middleton et al. 1977; Harris et al. 1979; Sarkkinen et al. 1979; 1980), contra-imunoelektroforese (Middleton et al. 1976; Spence et al. 1977; Obert et al. 1981; Hammond et al. 1984b), aglutinação com partículas de látex (Sanekata et al. 1981, Hammond et al. 1984b) e imunocromatografia (Wilhelmi et al. 2001). A detecção de RNA viral é realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida – PAGE (Pereira et al. 1983a) ou pela reação em cadeia pela polimerase (Wilde et al. 1991). Dentre essas, as mais utilizadas rotineiramente pelos laboratórios de análises clínicas são o ELISA, a imunocromatografia e a aglutinação com partículas de látex.

A microscopia eletrônica direta (EM) e a imuno-microscopia eletrônica podem ser usadas eficientemente para detectar a presença dos virions em amostras não concentradas em poucos minutos após sua coleta (Brandt et al. 1981). Entretanto, o alcance destas técnicas para laboratórios clínicos de rotina é limitado, por questões de custo.

Os testes imunoenzimáticos de captura em fase sólida, também, denominados como ELISA são geralmente mais sensíveis e mais práticos para a detecção de rotavírus em amostras fecais (Yolken et al. 1982, Yolken

1986) mas requerem tipicamente diversas horas para execução, podendo não ser ideal para simples triagens e são de custo elevado. Segundo Beards et al. (1984), a prova de ELISA é altamente sensível, específica e conveniente na detecção de rotavírus em fezes, porém, como todo teste sorológico, está diretamente relacionada com a qualidade dos anticorpos empregados. Pereira et al. (1985), padronizaram um método de ELISA para o diagnóstico de rotavírus e adenovírus em humanos. Este trabalho proporcionou o lançamento do “kit” EIARA da Fundação Oswaldo Cruz no Brasil, e foi posteriormente aperfeiçoado por Biomanguinhos (FIOCRUZ).

A prova de PAGE, apesar de ser uma técnica de alta especificidade, é bastante complexa e demorada, principalmente quando se dispõe de um número grande de amostras, como acontece, por exemplo, em casos de surtos.

Sanekata et al. (1981), foram os primeiros a descreverem um método de aglutinação em látex (LA) para a detecção de rotavírus nas fezes. Desde então foram descritos diferentes procedimentos de LA para a detecção de rotavírus (Hammond et al. 1984a; Morinet et al. 1984; Julkunen et al. 1985; Lukowicz et al. 1985; Pai et al. 1985; Miotti et al. 1986; Yolken & Leggiadro, 1986; Raj et al. 1989).

Chik et al. (1985), compararam o teste de Rotalex® (Orion Diagnostics, Finland), um teste comercial de látex para o rotavírus, com a microscopia eletrônica direta e o teste Rotazyme® (Abbott Laboratories, USA), um imunoenensaio enzimático comercial e concluíram que, o teste de Rotalex® teve uma sensibilidade de 81,7% e uma especificidade de 99,5% comparados com os resultados da microscopia eletrônica direta. Os valores preditivos positivos e negativos foram de 98 e 94,9%, respectivamente. O teste de Rotalex® foi ligeiramente mais sensível e específico do que o teste de Rotazyme®. A sensibilidade do teste Rotalex® variou dependendo da época da coleta das amostras, relativa ao início dos sintomas. A sensibilidade foi

>99,99% (20/20), 96% (23/24), e 54% (7/13) durante 1 a 4, 5 a 7, e 8 a 18 dias, respectivamente, após o início dos sintomas. A sensibilidade do teste de Rotazyme® variou similarmente com dias do início dos sintomas.

Foram examinadas também amostras negativas para a microscopia eletrônica e de pacientes assintomáticos. Os resultados falsos positivos para o teste Rotalex® foram de somente 3,3% (7/214) comparados com os 4,2% (9/215) para o teste Rotazyme®. O teste Rotalex® foi tão sensível e específico quanto a microscopia eletrônica direta para a detecção dos rotavírus durante o estágio agudo da doença e muito mais rápido e mais barato do que a microscopia eletrônica direta ou que o teste Rotazyme®. O teste demonstrou ser apropriado para o uso rotineiro em hospitais pequenos, em emergências, ou mesmo nos consultórios médicos para o diagnóstico rápido das gastroenterites por rotavírus.

Sambourg et al. (1985), compararam quatro técnicas: dois ensaios imunoenzimáticos (Rotazyme®; Abbott, USA, e Enzygnost-Rotavirus®; Calbiochem-Behring, USA) e dois testes de aglutinação de látex (Rotalex® e Slidex®; Biomérieux). Ambos os ensaios imunoenzimáticos forneceram 6% de resultados equívocos enquanto que os de látex forneceram apenas 2.9% de resultados duvidosos ($P < 0.01$). A sensibilidade e a especificidade dos testes de látex se mostraram favoravelmente comparáveis aos dos ensaios imunoenzimáticos. Os autores concluíram que os testes de aglutinação em látex podem ser executados por pessoal sem treinamento específico, são rápidos, relativamente baratos e muito apropriados para o trabalho rotineiro do laboratório e poderiam ser úteis para a triagem em grande escala em países em desenvolvimento.

Doern et al. (1986), testaram um total de 176 amostras fecais humanas para a presença de rotavírus por quatro ensaios diferentes: um ensaio imunoenzimático baseado em anticorpo monoclonal (Rotazyme I®); um aperfeiçoamento deste ensaio (Rotazyme II®); e um teste de aglutinação em

látex (Rotalex®), por microscopia eletrônica direta e imuno-microscopia eletrônica, e por eletroforese de RNA em gel. Um total de 40 amostras foram positivas em um ensaio imunoenzimático baseado em anticorpo monoclonal, e 136 foram negativas. Usando os resultados obtidos com este procedimento como o padrão da referência, foram encontrados valores de sensibilidade para os testes Rotazyme I®, Rotazyme II® e Rotalex® de 97,4, >99,9, e 81,6%, respectivamente. Os valores de especificidade destes três procedimentos foram 88,8, 83,9, e >99,99%, respectivamente.

Knisley et al. (1986), testaram um total de 100 amostras fecais de crianças com diarreia e compararam o teste comercial em látex, Rotalex®, com os seguintes testes também comerciais: teste de ensaio imunoenzimático a base de anticorpo monoclonal - Pathfinder® (Kallestad Laboratories, Inc., Austin, Texas), teste de ensaio imunoenzimático a base de anticorpo policlonal - Rotazyme II® (Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois), teste de ensaio imunoenzimático a base de anticorpo policlonal, com reagentes do National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (NIH reagente EIA), e microscopia eletrônica e concluíram que o teste em látex apresentava sensibilidade entre 94 e >99,9 % quando comparado com os outros métodos e >99,99% de especificidade quando comparado com a microscopia eletrônica.

Brandt et al. (1987), estudaram um teste de aglutinação em látex (Slidex®; BioMérieux) em comparação com a microscopia eletrônica direta e com um ensaio imunoenzimático, e comprovaram que este era um método rápido, facilmente usado para detectar o rotavírus em amostras fecais de crianças até de 5 anos de idade. Com 45 amostras a negativas, a sensibilidade do teste do LA foi de 82%, e a especificidade foi >99,99%. A frequência de testes positivos do LA pareceu ser proporcional à concentração dos virions nas amostras fecais.

Dennehy et al. (1988), testaram para rotavírus cem amostras fecais obtidas de pacientes com gastroenterite aguda utilizando nove ensaios imunes comerciais para avaliar a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo, e a exatidão diagnóstica destes testes. Foram avaliados dois ensaios imunoenzimáticos baseados em anticorpos monoclonais (Rotaclone®, Meridian Bioscience, USA e Pathfinder Rotavirus®), três ensaios imunoenzimáticos baseados em anticorpos policlonais (Rotavirus Immunoassay®, International Diagnostic Laboratories, USA, Rotazyme II® e Wellcozyme Rotavirus®, Wellcome Laboratories, USA), e quatro ensaios de aglutinação de látex (Rotastat®, Ranbaxy Diagnostic, India, Virogen Rotatest®, Wampole Laboratories, USA, Meritec-Rotavirus®, Meridian Diagnostics, Inc., USA, e o teste de látex da Wellcome). Trinta e oito das 100 amostras foram confirmadas como positivas por método imunoenzimático de referência. A exatidão do método de referência foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e por um teste de bloqueio em amostras discordantes. Os dois ensaios imunoenzimáticos baseados em anticorpos monoclonais mostraram valores de sensibilidade superiores (>99,99%). Entre os ensaios imunoenzimáticos baseados em anticorpos policlonais, todos os valores de sensibilidade foram ao redor de 90%, mas os valores de especificidade eram variáveis. Os testes de látex tiveram valores de sensibilidade variando entre 70 a 90% e de especificidade entre 80 e >99,99%. Os autores destacam que os testes de aglutinação de látex foram de execução mais rápida do que ensaios imunoenzimáticos e não requeriam equipamentos de elevado custo.

Kok & Burrell (1989), compararam o teste Slidex® (BioMeriex) com quatro diferentes testes imunoenzimáticos e microscopia eletrônica e concluíram que o teste Slidex® apresentava sensibilidade melhor que 98 % e especificidade melhor que 99%.

Thomas et al. (1994), usaram 434 amostras para avaliar dois ensaios comerciais de látex para detectar o rotavírus (Meritec-Rotavirus® e Rotalex

®) Os resultados do ensaio em látex foram comparados com microscopia eletrônica. Noventa e uma amostras (21%) eram positivas para o rotavírus. A sensibilidade, a especificidade, os valores preditivos positivos, e os valores preditivos negativos para os dois ensaios foram, respectivamente, Meritec-Rotavirus ® (97%, 99%, 97%, 99%) e Rotalex ® (91%, 99%, 94%, 98%).

2. JUSTIFICATIVA

A infecção por rotavírus tem caráter agudo podendo levar à desidratação e ao óbito em poucas horas. Neste caso o diagnóstico rápido e preciso deste vírus é fundamental para a adoção de medidas profiláticas, uma vez que a sintomatologia clínica consiste num quadro diarréico e, portanto, deve haver o diagnóstico diferencial com os demais agentes causadores de gastroenterites.

Baseados na experiência nacional e internacional neste tema, no Brasil, diferentes laboratórios universitários, de instituições de pesquisas e alguns laboratórios da rede oficial de Saúde Pública (LACENs) utilizam principalmente as técnicas de detecção de RNA viral por eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) e o teste imunoenzimático (EIARA) combinando a detecção de rotavírus e adenovírus (Pereira et al. 1983a; 1985;1993).

Nos laboratórios de análises clínicas brasileiros as técnicas e reagentes empregados rotineiramente para detecção de rotavírus em amostras fecais humanas, que são licenciadas pela ANVISA, fundamentam-se na captura de antígenos virais em fase sólida por aglutinação em látex, por imunocromatografia ou por ensaio imunoenzimático (ELISA). Sendo que, os reagentes a base de látex são os mais utilizados, por razões econômicas e de praticidade.

Todos os kits licenciados para venda no Brasil são importados com a exceção do EIARA- Biomanguinhos. A produção local de um kit a base de látex, representa uma oportunidade comercial e inovadora, além de possibilitar uma ampliação de aplicação a diversos segmentos de nossa sociedade devido ao seu custo e praticidade. A escolha desta tecnologia também se fundamenta na simplicidade de fabricação do conjunto de reativos e na disponibilidade de materiais nacionais para sua execução.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

O presente trabalho teve como objetivo, o desenvolvimento e padronização da técnica de imunoensaio de captura e aglutinação em látex, para o diagnóstico de infecções por rotavírus do grupo A, a partir de material fecal humano.

3.2 Objetivos Específicos:

- a) Desenvolvimento e padronização da técnica de imunoensaio de captura e aglutinação em látex.
- b) Comparação do ensaio padronizado com testes comerciais liberados pela ANVISA, utilizando amostras clínicas (fezes diarréicas).
- c) Estabelecimento dos parâmetros de estabilidade e sensibilidade analítica do ensaio padronizado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes:

4.1.1 Imunoglobulina anti-rotavírus:

Anticorpo policlonal de carneiro anti-rotavírus contendo 1,25 mg/mL de IgG foi adquirida da Chemicon International (Temecula, CA, USA) como uma fração de IgG preparada por precipitação com ácido octanóico a partir do plasma, e posteriormente purificada por cromatografia de afinidade com proteína A, acompanhada de certificado de análise, específica para reagir com os sorotipos humanos 1, 2, 3, e 4, também como, com cepas de rotavírus de origem bovina, suína e símia, que compartilham em comum o antígeno do grupo A. O anticorpo foi armazenado a 4 °C até sua utilização e é estável por 12 meses a 4 °C de acordo com o fabricante.

4.1.2 Controles:

A solução de controle positivo foi elaborada diluindo-se o antígeno de rotavírus obtido a partir de cultivo celular e purificado por centrifugação em gradiente de sacarose (Argene, North Massapequa - N.Y. 11758 - USA) conforme instruções do fabricante, na proporção de 1:100 em solução tamponada de glicina-salina (A1). Esta solução pronta foi armazenada a 4 °C até seu uso e é estável por 24 meses a 4 °C.

A solução de controle negativo foi elaborada diluindo-se albumina bovina a 4% (p/v) (A4503, Sigma-Aldrich, USA) em solução tamponada de glicina-salina (A1). A solução foi armazenada a 4 °C até sua utilização e é estável por 24 meses a 4 °C.

4.2 Soluções:

(a) Solução diluente (R1) contendo, glicina 0,09 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); NaCl 0,17 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); azida sódica 0,1% (p/v) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); pH $8,2 \pm 0,02$ (25 °C), corrigido com NaOH 10% (p/v). (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

(b) Solução tamponada de glicina-salina (A1) contendo, glicina 0,09 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); NaCl 0,17 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); azida sódica 0,1% (p/v) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); gelatina de peixe 0,5% (G7041, Sigma-Aldrich, USA) e Kathon CG® 0,08% (v/v) (Rhom & Haas, São Paulo, Brasil); pH $8,2 \pm 0,02$ (25 °C) corrigido com NaOH 10% (p/v). (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

(c) Solução tampão ácida (A2) contendo, glicina 0,01 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); NaCl 0,17 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); pH $2,5 \pm 0,02$ (25 °C) corrigido com HCl 10% (p/v). (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

(d) Solução tampão glicina-salina (A3) contendo, glicina 0,1 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); NaCl 0,17 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); azida sódica 0,1% (p/v) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); pH $8,2 \pm 0,02$ (25 °C) corrigido com NaOH 10% (p/v). (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

(e) Solução tampão de lavagem (A4) contendo, glicina 0,09 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); NaCl 0,17 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); azida sódica 0,1% (p/v) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); albumina bovina 1% (p/v) (A4503, Sigma-Aldrich, USA) e Tween 20 0,05 % (p/v) (P7949, Sigma-Aldrich, USA); pH $8,2 \pm 0,02$ (25 °C) corrigido com NaOH 10% (p/v). (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

(f) Solução protetora (A5) contendo, glicina 0,09 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); NaCl 0,17 M (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil); Kathon CG® 0,8% (v/v) (Rhom & Haas, São Paulo, Brasil); albumina bovina 1% (p/v) (A4503,

Sigma-Aldrich, USA); gelatina de peixe 2,5% (p/v) (G7041, Sigma-Aldrich, USA) e Tween 20 0,05 % (p/v) (P7949, Sigma-Aldrich, USA); pH $8,2 \pm 0,02$ (25 °C) corrigido com NaOH 10% (p/v). (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil).

As soluções foram armazenadas a 4 °C até sua utilização e são estáveis por 12 meses a 4 °C.

4.3 Amostras fecais:

As 81 amostras fecais utilizadas neste estudo, foram recebidas através do nosso serviço de apoio em análises clínicas (Laboratórios Integrados de Análises Clínicas do Rio de Janeiro, RJ, Brasil) entre maio e julho de 2004, oriundas de pacientes que apresentavam episódios de diarreia aguda de natureza infecciosa presumida, com idades variando entre 3 meses a 5 anos de idade, entre o 2º e o 5º dia do início da doença e cujo diagnóstico de cultura microbiana realizado pelo serviço de apoio não revelou a presença de bactérias enteropatogênicas, e que tiveram diagnóstico clinico-laboratorial para RV confirmado ou descartado pelo kit Rotazyme II® (Abbott Laboratories).

As amostras de fezes foram coletadas em frascos plásticos limpos e secos, livres de detergentes, em quantidades variando entre 3 e 4 mL, armazenadas para transporte até o laboratório à 4° C , e enviadas no mesmo dia da coleta, devidamente identificadas. Estas ao chegarem ao laboratório foram armazenadas a -20° C, sem prévia manipulação, até o momento das análises, por não mais que quinze dias (Hughes et al. 1984).

Dados dos pacientes e resultados prévios de laboratório foram lacrados e guardados separadamente, e só revelados para a análise dos resultados e conclusão do estudo.

4.4 Produção do látex revestido com anticorpo:

4.4.1 Tratamento do anticorpo

O anticorpo policlonal de carneiro anti-rotavírus foi tratado conforme descrito por Conradie et al. (1983). Foram diluídos 2 μ L da solução do anticorpo (1,25 mg/mL de IgG) em 200 μ L de uma solução tampão ácida (A2) aquecida a 82 °C. Incubou-se esta por 10 minutos a temperatura ambiente e em seguida o volume total foi diluído com 750 μ L de uma solução tampão glicina-salina (A3) previamente refrigerada a 4 °C. Esta solução final foi utilizada imediatamente para sensibilização do látex.

4.4.2 Sensibilização do látex

A sensibilização do látex revestido com anticorpo policlonal de carneiro anti-rotavírus foi executada conforme descrito por Hoff & Prevorsek (1977). Para cada 40 μ L de látex, uma suspensão de micro-esferas contendo 50% (p/v) de partículas (com diâmetros de 800 e 80 μ m na proporção 1:5) (LBD-80/800, Biodevices, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), foram incubados com 1 mL da solução tratada de anticorpo por um período entre 1 e 24 horas, de acordo com a padronização da sensibilização, a uma temperatura ambiente de 25 °C, resultando numa suspensão de látex sensibilizado com uma concentração de partículas de 2 % (p/v). Após o período de sensibilização a suspensão de micro-esferas sensibilizadas foi transferida para tubos de centrifugação de 10 mL, Procedeu-se três lavagens com 5 mL de solução tampão de lavagem (A4). Após cada lavagem as micro-esferas foram recuperadas por centrifugação por 8 minutos a 22000g (18 °C). Finalmente o látex foi ressuscitado em 0,45 mL do tampão de lavagem (A4) e 0,05 mL de solução protetora (A5). Esta suspensão foi armazenada a 4 °C, até o momento do uso e denominado como LTE (Látex – Teste – desenvolvimento E).

4.4.3 Padronização da sensibilização do látex

A fim de otimizar o teste, o látex foi sensibilizado com anticorpo policlonal de carneiro anti-rotavírus nas diluições 1/100, 1/250, 1/500, 1/750 e 1/1000 em solução diluente (R1), para se verificar qual diluição mínima poderia ser utilizada para o sistema (Hughes et al. 1984). A seguir cada diluição foi testada com o controle positivo não diluído, e diluído 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/5000 e 1/10000 em solução diluente (R1). Como controle negativo, empregaram-se não diluídos: (a) o controle negativo do sistema LTE, (b) soro não imune (normal) de cobaio (ES1025, Biomed, Foster City, CA, USA), (c) imunoglobulina G de cobaio (M126, Biomed, Foster City, CA, USA), (d) *pool* de soros de crianças até 5 anos de idade, que não apresentavam quadro de gastroenterite (LIAC, Rio de Janeiro, Brasil), (e) soro fetal bovino (ES1065, Biomed, Foster City, CA, USA).

A padronização descrita foi também aplicada, variando-se o tempo de sensibilização (1h e 24h de incubação) e o pH (7,4; 8,2 e 9,2) da solução tampão glicina-salina (A3) em ambos os tempos, para otimização destas variáveis.

A seguir, cinco diferentes concentrações de látex (0,25; 0,5; 1; 2 e 4 %) sensibilizado com uma diluição 1:500 de anticorpo em pH 8,2 por vinte e quatro horas foram testadas, a fim de se determinar a aglutinação ótima.

4.5 Análises:

4.5.1 Teste com Rota-Kit Slidex® – Biomérieux, Brasil:

Este é um teste rápido em lâmina a base de látex recoberto com anticorpos policlonais específicos para os rotavírus do grupo A, licenciado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso em diagnósticos laboratoriais. em amostras fecais humanas. Este kit que foi utilizado para os testes de acordo com as instruções do fabricante.

O Rota-Kit Slidex® consiste: (a) de uma suspensão do látex revestida com anticorpo de coelho anti RV (R1), (b) uma suspensão negativa do látex do controle (R2), (c) um controle positivo do antígeno (rotavírus inativado) (R3), (d) uma solução tampão (pH 7,2) (R4), (e) varetas plásticas para mistura, e (f) uma lâmina de vidro reutilizável. Uma suspensão de 20% (vol/vol) de cada amostra foi preparada em um tubo de centrifugar com tampa de rosca de 15mL por mistura em vortex de aproximadamente 0,2 g de fezes com 1 ml de tampão. A suspensão foi incubada por 10 minutos a temperatura de ambiente e então centrifugada por 10 minutos em 800 x g. Uma gota do reagente R1 foi adicionada a um círculo da lâmina de vidro, e uma gota do reagente R2 foi adicionada a um outro círculo. O teste foi realizado com uma gota do sobrenadante de fezes que foi adicionada a cada círculo e misturada com os reagentes usando as varetas plásticas. A lâmina de vidro foi agitada de modo circular por 2 minutos a temperatura de ambiente em um agitador de placas de Kline. Os padrões de aglutinação foram lidos então sob a luz fluorescente existente no laboratório e foram verificados também usando uma lupa. Os resultados foram considerados positivos quando ocorria aglutinação visível e negativos quando a suspensão permanecia leitosa após 2 minutos. Os testes foram considerados indeterminados se houvesse uma aglutinação somente com a suspensão R2 ou com as suspensões R1 e R2. As amostras que exibiram reações indeterminadas foram re-centrifugadas por 10 minutos cada a 2.300 x g, e o procedimento de teste foi repetido. Os reagentes controle

positivo (antígeno) e controle negativo (tampão) foram usados para o controle de qualidade do procedimento antes de cada bateria de testes.

4.5.2 Teste com LTE:

O sistema de LTE consistiu de: (a) uma suspensão do látex sensibilizada com anticorpo anti-rotavírus (R2), (b) controle positivo (R3) e (c) controle negativo (R4), (d) em uma solução diluente (R1).

Para os testes de aglutinação em látex com o sistema, foram empregadas amostras representativas de 1 a 2 mL ou 1 a 2 g de fezes de cada paciente. Estas foram dissolvidas numa proporção de 20% (p/v) em 2 mL de solução diluente (R1) em tubo de centrifuga com tampa de rosca de 15mL, vigorosamente agitadas em um misturador de vortex, e deixadas em repouso, a temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir as amostras foram centrifugadas a 800g por 10 minutos e os sobrenadantes codificados foram armazenados a -20 °C, para uso posterior, em não mais que 7 dias.

Os testes foram executados do seguinte modo: a um tubo de ensaio (12 x 75 mm) foram adicionados 20 µL do reagente R2 e 500 µL do sobrenadante. Procedeu-se uma agitação suave para homogeneizar a suspensão por 1 minuto a temperatura ambiente. A seguir incubou-se por 15 minutos em Banho-Maria a 37 °C. Os padrões de aglutinação foram lidos então sob a luz fluorescente existente no laboratório. Os resultados foram considerados positivos quando ocorria aglutinação e negativos quando a suspensão permanecia leitosa após incubação. Cada bateria de testes era acompanhada da reação com o controle positivo (antígeno R3) e negativo (R4) para o controle de qualidade do procedimento. A única diferença é que se utilizava 20 µL dos controles diluídos em 500 µL de solução diluente (R1) e omitiu-se a etapa centrifugação.

4.6 Testes comparativos

4.6.1 Especificidade e sensibilidade analítica:

O sistema LTE foi comparado ao Rota-Kit Slidex® (Biomérieux, Brasil), em sensibilidade e especificidade analítica com as 81 amostras do estudo empregando-se para cálculo as seguintes fórmulas (Al-Yousif et al. 2000):

$$\text{Sensibilidade} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}} \times 100$$

onde,

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

FN = resultados negativos falsos.

$$\text{Especificidade} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FP}} \times 100$$

onde,

TN = resultados negativos verdadeiros determinados com o teste de referência,

FP = resultados positivos falsos.

4.6.2 Sensibilidade analítica mínima relativa.

A sensibilidade analítica mínima relativa foi determinada de acordo com o descrito em Hughes et al. (1984). O sistema LTE foi comparado ao Rota-Kit Slidex® (Biomérieux, Brasil) com 10 amostras fecais positivas para rotavírus selecionadas aleatoriamente diluídas com solução diluente (R1), a

fim de se determinar a maior diluição que apresentava resultado positivo (aglutinação).

4.6.3 Comparação entre o LTE e o Rotazyme II® quanto a especificidade e sensibilidade analítica

Adicionalmente foi realizado um teste comparativo com o Rotazyme II®, dentro do limite inferior de detecção do sistema LTE, que foi determinado em relação ao Rota-Kit Slidex®. Foram diluídas previamente na proporção de 1:20 em solução diluente (R1), 36 amostras com resultados positivos e 45 que deram resultados negativos quando testadas e confirmadas com o Rotazyme II® e Rota-Kit Slidex®. A diluição foi escolhida com base nos testes comparativos ao Rota-Kit Slidex®.

4.7 Repetitividade e reprodutividade

O teste de imprecisão foi determinado de acordo com o descrito em Hughes et al. (1984). A repetitividade e a reprodutividade do LTE foram examinadas para 3 amostras positivas e 3 negativas reproduzindo-se 10 vezes o teste no mesmo dia (repetitividade) e em 10 dias diferentes (reprodutividade), selecionadas aleatoriamente e testadas com o Rota-Kit Slidex® (Biomérieux, Brasil) e confirmadas pelo Rotazyme II® (Abbott Laboratories). As amostras utilizadas para os testes de reprodutividade foram armazenadas a – 20 °C e descongeladas uma só vez para o teste.

As amostras positivas foram também testadas diluídas para se verificar o efeito da matriz nos testes de imprecisão. Foram utilizadas diluições máximas que apresentavam reação de aglutinação.

4.8 Bloqueio da reação

Para o teste de bloqueio da aglutinação (Hughes et al. 1984), empregaram-se amostras 10 amostras positivas selecionadas aleatoriamente e confirmadas pelo Rota-Kit Slidex® (Biomérieux, Brasil) e Rotazyme II® (Abbott Laboratories). Uma diluição 1:100 com solução diluente (R1), do mesmo anticorpo anti-rotavírus utilizado para a sensibilização do látex foi adicionada às amostras testadas. Foram adicionados 20 µL do anticorpo diluído a 500 µL do sobrenadante proveniente do processamento da amostra de acordo com técnica descrita para o teste com o LTE, incubou-se por 5 minutos a 37 °C e procedeu-se o teste para avaliação da aglutinação. Este teste serviu para verificar se a imobilização do anticorpo sobre a superfície do látex, alterou a especificidade da reação, nas condições do teste.

4.9 Teste de estabilidade acelerado:

Os reativos do sistema LTE foram armazenados a 4 °C e a 37 °C e testados quanto a manutenção da sensibilidade analítica, durante um período de 6 meses por turbidimetria (U.S. Food and Drug Administration, 2000). Os testes de aglutinação foram executados com o controle positivo diluído 1:500 com solução diluente (R1), e a absorbância obtida no primeiro dia antes do período de armazenagem foi considerada como 100 % de sensibilidade.

A técnica de análise por turbidimetria (Sobanski et al. 2000), consistiu em diluir a reação após o teste de aglutinação com 5 mL de tampão para turbidimetria, misturar suavemente por 5 minutos para homogeneização da reação, colocar 1 mL desta em uma cubeta com 1 cm de caminho ótico e ler a absorbância resultante em espectrofotômetro (Beckman-Coulter DU® 500 UV/Vis) em 340 nm contra branco de água destilada. Os cálculos da variação percentual da sensibilidade foram realizados com a seguinte fórmula:

$$\text{Sensibilidade\%t} = \frac{A_t}{A_i} \times 100$$

Onde,

t = Amostra de reagente em teste

A_t = Absorbância obtida para t

A_i = Absorbância obtida inicialmente ao período de armazenagem (100%)

O cálculo do prazo de validade foi executado com o software SlimStat plus ® (H&A Scientific, USA) que suporta cálculos de estabilidade acelerada com a equação de Arrhenius (European Committee for Standardization, 2001). Este software mede a cinética de degradação de produtos e materiais comparando por análise estatística parâmetros que indiquem uma degradação, como por exemplo, diminuição da concentração ou atividade biológica de um princípio ativo, aumento de friabilidade de um comprimido, alteração de pH de uma formulação, etc. Os dados são obtidos após se submeter o material ou produto em condições adversas, como por exemplo, temperatura elevada, luminosidade intensa, umidade, etc; e comparar a alteração de um ou mais parâmetros contra condições normais de armazenagem. Uma curva obtida permite estimar por extrapolação o período em que o produto ou material retém suas características ou funções desejadas, ou seja, sua validade (Lin & Chen 2003)

5. RESULTADOS

5.1 Padronização e sensibilização do látex

Inicialmente as partículas de látex foram sensibilizadas, com várias diluições do anticorpo de carneiro anti-rotavírus em solução diluente (R1) pH 8,2, durante 24 horas à temperatura de 25°C, para uma concentração final de 2% (p/v) de partículas de látex sensibilizadas. O teste de aglutinação foi executado contra diferentes diluições do controle positivo e contra controles negativos, para se verificar qual concentração mínima de anticorpo poderia ser utilizada, sem que o desempenho do teste fosse comprometido.

Os resultados da sensibilização do látex são apresentados na tabela 1. As reações de aglutinação foram classificadas como positivas quando ocorria floculação visível no meio, como negativas quando o meio permanecia leitoso, e como duvidosas quando ocorria aglutinação muito fraca ou pouco visível.

Conforme demonstrado na tabela 1, nenhuma aglutinação foi observada na reação com os controles negativos. A detecção do antígeno até a diluição 1/100 ocorreu para todas as diluições da solução de anticorpo até 1/500. A concentração mínima ótima de anticorpo para a sensibilização do látex se define como aquela que origina uma aglutinação visível, específica e sensível para a detecção do antígeno. Definimos então a diluição 1/500 do anticorpo de carneiro como a ideal para o prosseguimento dos experimentos.

Tabela 1 – Análise da reação obtida com diferentes concentrações de anticorpo na sensibilização do látex frente a várias diluições do antígeno RV (controle positivo) e controles negativos.

| Diluição do Controle positivo | Diluição do anticorpo utilizado na sensibilização | | | | |
|-------------------------------|---|-------|-------|-------|--------|
| | 1:100 | 1:250 | 1:500 | 1:750 | 1:1000 |
| Não diluído | + | + | + | - | - |
| 1:5 | + | + | + | - | - |
| 1:10 | + | + | + | - | - |
| 1:50 | + | + | + | - | - |
| 1:100 | + | + | + | - | - |
| 1:500 | ± | - | - | - | - |
| 1:5000 | - | - | - | - | - |
| 1:10000 | - | - | - | - | - |
| Controle (-) do sistema LTE | - | - | - | - | - |
| Soro normal de cobaio | - | - | - | - | - |
| Imunoglobulina G de cobaio | - | - | - | - | - |
| Pool de soros de crianças | - | - | - | - | - |
| Soro fetal bovino | - | - | - | - | - |

(+) aglutinação positiva

(-) aglutinação negativa

(±) aglutinação duvidosa

Partículas de látex sensibilizadas em pH 8,2 durante um período de 24h

Após definição da diluição ótima do anticorpo para a sensibilização do látex, foram também avaliados quais eram o melhor pH e o tempo de incubação. O látex sensibilizado por 24 horas, demonstrou reação mais sensível para detecção do antígeno do que a reação obtida para as partículas de látex incubadas por somente 1 hora nas mesmas condições (Tabela 2). A sensibilização do látex com anticorpo diluído em tampão glicina-salina (A3) em pH 7,4 ou 8,2 apresentou resultados similares, sendo a reação nestes valores de pH mais sensível do que os resultados obtidos para as diluições no mesmo tampão em pH 9,2 (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise do tempo e pH necessários para sensibilização do látex na reação de aglutinação.

| Diluição do Controle positivo | Aglutinação nas condições especificadas | | | | | |
|-------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 7,4 | | 8,2 | | 9,2 | |
| | 1h | 24h | 1h | 24h | 1h | 24h |
| Não diluído | + | + | + | + | + | + |
| 1:5 | + | + | + | + | + | + |
| 1:10 | + | + | + | + | + | + |
| 1:50 | + | + | + | + | + | + |
| 1:100 | + | + | + | + | - | + |
| 1:500 | - | ± | - | ± | - | - |
| 1:5000 | - | - | - | - | - | - |
| Controle (-) do sistema LTE | - | - | - | - | - | - |
| Soro normal de cobaio | - | - | - | - | - | - |
| Imunoglobulina G de cobaio | - | - | - | - | - | - |
| Pool de soros de crianças | - | - | - | - | - | - |
| Soro fetal bovino | - | - | - | - | - | - |

(+) aglutinação positiva
 (-) aglutinação negativa
 (±) aglutinação duvidosa
 Anticorpo diluído 1:500, pH e tempo

Foram testadas cinco diferentes concentrações de látex sensibilizados com a diluição 1:500 do anticorpo anti-rotavírus em tampão glicina-salina (A3) pH 8,2 por vinte e quatro horas, quanto à aglutinação ótima. As partículas de látex nas concentrações variando de 0,5 a 4% (p/v) apresentaram resultados de aglutinação similares (Tabela 3). Determinou-se então que a concentração mínima ótima de látex sensibilizado para leitura da aglutinação, nestas condições, foi de 0,5 %.

Tabela 3 – Análise da concentração mínima ótima de látex sensibilizado para reação da aglutinação.

| Diluição do Controle positivo | Concentração do Látex sensibilizado | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|-------|-----|-----|----|
| | 0,25 % | 0,5 % | 1 % | 2 % | 4% |
| Não diluído | + | + | + | + | + |
| 1:5 | + | + | + | + | + |
| 1:10 | + | + | + | + | + |
| 1:50 | + | + | + | + | + |
| 1:100 | ± | + | + | + | ± |
| 1:250 | - | ± | ± | ± | ± |
| 1:500 | - | ± | ± | ± | ± |
| 1:1000 | - | - | - | - | - |
| Controle (-) do sistema LTE | - | - | - | - | - |
| Soro normal de cobaio | - | - | - | - | - |
| Imunoglobulina G de cobaio | - | - | - | - | - |
| Pool de soros de crianças | - | - | - | - | - |
| Soro fetal bovino | - | - | - | - | - |

(+) aglutinação positiva

(-) aglutinação negativa

(±) aglutinação duvidosa

Anticorpo diluído 1:500, pH 8,2 durante um período de 24h.

5.2 Teste comparativo com Rota-Kit Slidex® (Biomérieux, Brasil), especificidade e sensibilidade analítica.

As partículas de látex sensibilizadas conforme as condições definidas como ótimas pelos parâmetros testados anteriormente resultaram no kit denominado LTE. O LTE foi então utilizado para testar 81 amostras fecais de crianças com diarreia. Os resultados obtidos foram comparados em sensibilidade e especificidade analítica (tabela 4). Das 81 amostras testadas, 45 foram consideradas negativas e 36 consideradas positivas para ambos os testes. Com estas amostras, a sensibilidade analítica comparativa foi maior que 99,99% para o sistema proposto. Não ocorreram reações falso-positivas ou falso-negativas e, portanto a especificidade analítica comparativa foi maior que 99,99%.

Tabela 4 – Comparação entre os resultados obtidos no LTE e Rota-Kit Slidex® (Biomérieux, Brasil), para a detecção de RV em 81 amostras fecais.

| LTE | Rota-Kit Slidex® | | Total |
|--------------|------------------|----------|-------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivos | 36 | 0 | 36 |
| Negativo | 0 | 45 | 45 |
| Total | 36 | 45 | 81 |

5.3 Sensibilidade analítica mínima – limite inferior de detecção

Os resultados obtidos nos testes de aglutinação com diluições seriadas de 10 amostras positivas para RV estão apresentadas na tabela 5. Verificamos que o teste com o LTE foi 20 vezes mais sensível para 5 amostras testadas (1, 5, 6, 8 e 10) que com o Rota-Kit Slidex®. Para 3 amostras (amostras 2, 3 e 7) o LTE foi 25 vezes mais sensível e para as duas restantes (amostras 4 e 9) foi 50 vezes mais sensível que o Rota-Kit Slidex®.

Tabela 5 – Sensibilidade analítica mínima do LTE comparativa ao Rota-Kit Slidex®

| Amostra fecal | Maior diluição da amostra fecal com resultado positivo no teste de aglutinação | |
|---------------|--|------------------|
| | LTE | Rota-Kit Slidex® |
| 6 | $\frac{1}{5000}$ | $\frac{1}{250}$ |
| 2 | $\frac{1}{2500}$ | $\frac{1}{100}$ |
| 1 | $\frac{1}{1000}$ | $\frac{1}{50}$ |
| 5 | $\frac{1}{1000}$ | $\frac{1}{50}$ |
| 10 | $\frac{1}{1000}$ | $\frac{1}{50}$ |
| 8 | $\frac{1}{1000}$ | $\frac{1}{50}$ |
| 4 | $\frac{1}{500}$ | $\frac{1}{10}$ |
| 3 | $\frac{1}{250}$ | $\frac{1}{10}$ |
| 7 | $\frac{1}{250}$ | $\frac{1}{10}$ |
| 9 | $\frac{1}{500}$ | $\frac{1}{10}$ |

5.4 Comparação entre o LTE e o Rotazyme II® quanto a especificidade e sensibilidade analítica

O LTE demonstrou uma sensibilidade de 94,0 % nas condições utilizadas (amostras diluídas 1:20), quando comparado com o Rotazyme II® (34 de 36 positivos); a especificidade foi de >99,99 % (45 de 45 negativas), não tendo sido encontrados resultados falso negativos (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação entre o LTE e Rotazyme II® quanto a especificidade e sensibilidade analítica

| LTE | Rotazyme II® | | Total |
|--------------|--------------|----------|-------|
| | Positivo | Negativo | |
| Positivo | 34 | 0 | 34 |
| Negativo | 2 | 45 | 47 |
| Total | 36 | 45 | 81 |

5.5 Repetitividade e Reprodutibilidade

A repetitividade do LTE foi examinada para três amostras positivas e três amostras negativas selecionadas aleatoriamente entre as 81 amostras testadas com o Rota-Kit Slidex® e confirmadas pelo Rotazyme II®. As amostras utilizadas para os testes de reprodutibilidade foram armazenadas a – 20 °C e descongeladas uma só vez para o teste. Os testes com o LTE demonstraram repetitividade e reprodutibilidade melhor que > 99,99% tanto nas amostras testadas sem diluição e com diluição dentro do limite de aglutinação positiva.

5.6 Bloqueio da reação

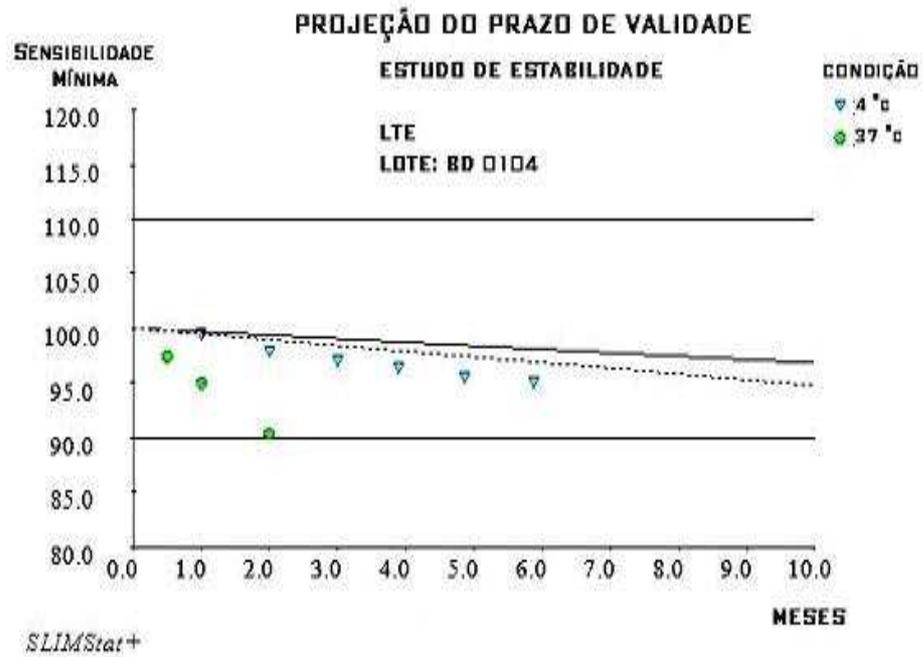
Para o teste de bloqueio da aglutinação, empregaram-se dez amostras positivas escolhidas entre aquelas confirmadas pelo Rota-Kit Slidex® e Rotazyme II® e que foram submetidas a diluição seriada. Uma diluição 1:100 de anticorpo de carneiro anti-rotavírus, foi previamente adicionada as amostras testadas. Nenhuma reação positiva foi detectada depois da reação da amostra fecal com o soro anti-RV, demonstrando a especificidade da reação de aglutinação pelo LTE.

5.7 Estabilidade do LTE (teste acelerado)

Os reativos do sistema LTE foram armazenados a 4 °C e a 37 °C e examinados durante 6 meses por turbidimetria conforme descrito na tabela 7. Não ocorreu redução na sensibilidade e não se observou tendência à aglutinação espontânea durante este período (6 meses) de armazenagem para a temperatura de 4 °C, contudo, para a temperatura de 37 °C ocorreu queda de sensibilidade após o 2º mês.

Com os dados obtidos estimou-se pela curva obtida pela equação de Arrhenius que o reativo tem uma estabilidade em prateleira (4°C) de 32 meses (tabela 7).

Tabela 7 – Estudo de estabilidade acelerada para projeção do prazo de validade dos kits LTE



Dados utilizados para cálculo:

| Condição 1 | | 4 °C | |
|-------------------|-------|--------------|-------|
| Tempo (meses) | 1 | 3 | 6 |
| Resultados (%) | 99,50 | 98,00 | 97,00 |
| Condição 2 | | 37 °C | |
| Tempo (meses) | 0,5 | 1 | 2 |
| Resultados (%) | 97,5 | 95,10 | 90,4 |

Sensibilidade mínima inicial = 100,0 %.

Resultados para reação de ordem zero:

Projeção de acordo com a equação de Arrhenius a 4,0° C = 32 meses.

Resultados para reação de primeira ordem:

Projeção de acordo com a equação de Arrhenius a 4,0° C = 33 meses.

6. DISCUSSÃO

Desde a sua primeira detecção (Bishop et al. 1973) em biopsias duodenais obtidas de crianças com diarreia aguda, por microscopia eletrônica, os rotavírus humanos têm sido objeto de estudo por diversos pesquisadores em todo mundo por ser o principal agente causador de gastroenterite infantil (Parashar et al. 2003)

A infecção tem caráter agudo podendo levar à desidratação e ao óbito em poucas horas. Neste caso o diagnóstico rápido e preciso deste vírus é fundamental para a adoção de medidas profiláticas, uma vez que a sintomatologia clínica consiste num quadro diarreico e, portanto, deve haver o diagnóstico diferencial com os demais agentes causadores de gastroenterites (Parashar et al. 2003).

O diagnóstico laboratorial da infecção por rotavírus é feito através da detecção direta de partículas, antígenos ou RNA viral em amostras fecais, através de diferentes técnicas e reagentes. O desenvolvimento de testes imunoenzimáticos sensíveis e específicos tornou este tipo de ensaio o método de escolha para o diagnóstico de rotavírus na maioria dos laboratórios de diagnóstico clínico. Comparações entre estes testes foram exaustivamente realizadas, considerando sempre os parâmetros de especificidade, sensibilidade e custo x benefício (Altindis et al. 2004)

A fim de desenvolver métodos de diagnóstico de simples execução e baixo custo foram descritos testes utilizando aglutinação de hemácias revestidas por anticorpo (Matsuno & Nagayoshi 1978; Sanekata et al. 1979; Sanekata & Okada 1983) assim como co-aglutinação com *Staphylococcus* (Skaug et al. 1983). Com este mesmo objetivo, também utilizando aglutinação e leitura visual, foram desenvolvidos testes com partículas de látex revestidas com anticorpos específicos (Sanekata et al. 1981; Cevenini et al. 1983; Haikala et al. 1983; Hughes et al. 1984).

Estudos anteriores demonstraram que os testes a base de látex são pelo menos entre duas e quatro vezes mais sensíveis que a microscopia eletrônica (Sanekata et al. 1981; Haikala et al. 1983). O teste de aglutinação em látex desenvolvido por Haikala et al. (1983) mostrou-se capaz de detectar de 30 a 100 ng/mL de antígeno de rotavírus enquanto que de 1 a 10 ng/mL foram detectados por radio-imunoensaio.

Atualmente no Brasil, diferentes laboratórios da rede oficial de Saúde Pública (LACENs) utilizaram principalmente o teste imunoenzimático (EIARA) combinando a detecção de rotavírus e adenovírus (Pereira et al. 1983; 1985; 1993).

No presente trabalho objetivou-se desenvolver um método de detecção por captura e aglutinação usando uma plataforma de látex para o diagnóstico de rotavírus do grupo A, a partir de material fecal e compará-lo com um kit comercial substancialmente equivalente. Para tanto, utilizou-se uma preparação certificada de IgG total de carneiro anti-rotavírus como anticorpo de captura, conjugado a micropartículas de látex.

Inicialmente, o teste de látex (LTE) foi padronizado para se determinar às condições ótimas de sensibilização com o anticorpo (Tabela 1). Durante a padronização não foram observadas reações de aglutinação não específicas como observadas, por exemplo, por Sanekata et al. (1981). Acreditamos que a ausência de aglutinação inespecífica no LTE foi decorrente dos cuidados tomados em relação à qualidade das micro-esferas e do anticorpo, bem como pelas condições escolhidas para a sensibilização. Entre as principais causas de aglutinação inespecífica na aglutinação em látex estão o excesso de imunoglobulina recobrindo a micro-esfera e a ausência de bloqueio de sítios hidrofóbicos presentes na partícula de látex (Ortega-Vinuesa et al. 2001; Xu & Logan, 2005).

Quando as partículas de látex são recobertas com soluções de imunoglobulinas purificadas por cromatografia de afinidade (IgG total),

demonstram maior sensibilidade pelo antígeno de rotavírus humano, do que quando são sensibilizadas com soros hiperimunes sem prévia purificação (Hughes et al. 1984). Esta elevação da sensibilidade é possivelmente devido a maior concentração de imunoglobulina anti-rotavírus sobre as partículas de látex sensibilizadas, se comparadas com aquelas recobertas com o soro hiperimune, onde é possível o acoplamento ao látex de outras proteínas séricas além da IgG..

A sensibilização ótima para a detecção do antígeno ocorreu para diluições da solução de anticorpo de 1: 500 (Tabela 1), em pH 8,2, com um tempo de incubação de 24 horas e uma concentração de 0,5 % (p/v) de partículas na suspensão (Tabelas 2 e 3). Estes resultados foram comparáveis aos obtidos por Hughes et al. (1984).

Os resultados comparativos entre o LTE e o Rota-Kit Slidex® para as 81 amostras testadas (45 negativas e 36 positivas) para ambos os sistemas, demonstraram que a sensibilidade analítica comparativa do LTE foi maior que 99,99%, e não ocorreram reações falso-positivas ou falso-negativas, fornecendo uma especificidade analítica comparativa maior que 99,99% (Tabela 4).

O teste LTE demonstrou ser pelo menos 20 vezes mais sensível que o Rota-Kit Slidex® (Tabela 5). Esta maior sensibilidade é devido a formação de um maior número de ligações dentro do complexo de grumos, favorecido pelo efeito de preenchimento de espaços dentro do complexo por microsferas de tamanhos diferentes. Também a absorção eficiente do anticorpo sobre a superfície do látex promovida pela maior exposição de grupos hidrofóbicos, após seu tratamento, evita a dissociação superficial destes durante a formação dos grumos.

Adicionalmente foi realizado um teste comparativo com o Rotazyme II® dentro do limite inferior de detecção do sistema LTE, levando em

consideração que este é vinte vezes mais sensível que o Rota-Kit Slidex® conforme resultados apresentados. O LTE demonstrou uma sensibilidade de 94,0 % nas condições utilizadas, quando comparado com o Rotazyme (34 de 36 positivos), e a especificidade foi de >99,99 % (45 de 45 negativas), não tendo sido encontrados resultados falso negativos (Tabela 6).

Os resultados de sensibilidade e especificidade analíticas obtidas com o LTE foram equivalentes aos obtidos por Amer et al (1993), Sanchez et al (1993), Carducci et al. (1988), Lipson & Zelinsky-Papez (1989), Mathewson et (1989), Al-Yousife et al. (2001), Altindis et al. (2004), quando compararam kits substancialmente equivalentes.

Os testes de imprecisão do sistema LTE demonstraram uma repetitividade e reprodutibilidade melhor que >99,99% (Tabela 7.5). Resultados comparáveis aos obtidos, para este tipo de avaliação, por Sanchez et al. (1993), Hughes et al. (1984) e Carducci et al. (1998).

Como demonstrado os testes de látex oferecem boa sensibilidade e são muito úteis para testes de triagem. Como grandes quantidades de antígeno de rotavírus estão presentes nas fezes de doentes com diarreia não é necessário que o teste de triagem seja ultra-sensível como os de enzima-imunoensaio. Um teste rápido e sensível é de grande valor, quando ele reduz significativamente o número de amostras a serem analisadas por outro teste mais elaborado e demorado, como por exemplo, o Rotazyme II® (Altindis et al. 2004). A eliminação de amostras positivas no teste de triagem representa uma grande economia de tempo e de custos.

A especificidade da reação de látex para rotavírus foi demonstrada por Sanekata et al. (1981), num teste de bloqueio. Nossos resultados também demonstraram 100% de especificidade do LTE quando bloqueamos a aglutinação de nossas amostras utilizando uma diluição 1:100 de anticorpo de carneiro anti-rotavírus.

Sanekata et al. (1981), observaram redução da sensibilidade de partículas sensibilizadas com imunoglobulina anti-rotavírus de carneiro armazenadas por 6 meses a 4 °C, e as partículas de látex sensibilizadas com imunoglobulina G anti-rotavírus (anti-SA-11) se demonstraram estáveis, não apresentando aglutinação espontânea e perda de atividade, quando armazenadas por 8 meses a 4 °C. Estes autores demonstraram ser possível desenvolver um teste de látex para detecção de rotavírus com excelente prazo de validade.

No sistema LTE as partículas de látex sensibilizadas com imunoglobulina G de carneiro anti-rotavírus se demonstraram estáveis, conforme resultados do teste de estabilidade acelerado (tabela 7). Calculou-se por extrapolação de dados nas condições deste teste que o sistema é estável por pelo menos 32 meses se armazenado sob refrigeração (4°C). Resultados estes bem superiores ao de Sanekata et al. (1981)

A avaliação da eficiência analítica do LTE no diagnóstico laboratorial de rotavirus foi realizada com 81 amostras fecais (45 positivas e 36 negativas) que haviam sido previamente testadas com o Rota-Kit Slidex® e confirmadas com o Rotazyme II®. Os testes com LTE foram realizados de forma cega sem que os resultados anteriores fossem conhecidos. Não foram encontrados resultados falsos positivos ou negativos nesta avaliação. Posteriormente será necessário um estudo prospectivo de eficiência diagnóstica mais amplo para se determinar a confiabilidade e segurança do LTE para diagnóstico do rotavírus. A adequação do teste de látex para detecção de rotavírus em amostras fecais humanas foi exhaustivamente descrita por Sanekata et al. (1981) e Haikala et al. (1983), esperamos portanto que o LTE demonstre igualmente a mesma eficiência.

O teste de látex é mais rápido e simples que os de metodologia por enzima-imunoensaio como o Rotazyme II®. Para laboratórios de pequeno porte o teste em látex demonstra ser a metodologia ideal. A rapidez dos

resultados obtidos nos testes em látex é importante no pronto atendimento aos pacientes, com a obtenção de resultados em menos de 15 minutos, enquanto que testes de imunoensaio como o Rotazyme II® levam cinco horas para a obtenção do resultado. Este tipo de teste também demonstra ser de grande importância para triagem de grandes grupos de pacientes em virtude de sua simplicidade. Devemos ainda lembrar que o LTE poderá ser facilmente adaptado em sistemas de leitura automática (turbidimetria e nefelometria) disponíveis em nosso país.

Descrevemos neste estudo a comparação do LTE com um teste substancialmente similar amplamente utilizado nos laboratórios clínicos brasileiros, o Rota-Kit Slidex®. Tomamos como base deste estudo as normas para licenciamento de produtos para diagnóstico *in vitro* reguladas pela autoridade sanitária brasileira, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que é fundamentada em normas de estudo e registro de diversas autoridades regulatórias de outros países como o Food and Drug Administration (FDA) e EMEA, entre outras. Os resultados aqui apresentados são suficientes para a submissão e aceitação do teste sob a forma de kit comercial no Brasil e Mercosul.

7. CONCLUSÕES

- O LTE demonstra utilidade e praticidade para a detecção de rotavírus em amostras clínicas.
- Esta metodologia apresenta diversas vantagens como a rapidez de execução como ainda os testes em látex, com leitura visual, dispensam o uso de equipamentos de elevado custo, são de baixa complexidade na sua execução, e tem sensibilidade suficiente para a rotina de diagnóstico.
- O LTE é estável por pelo menos 2 anos se armazenado sob refrigeração (4°C) e se mostra útil para laboratórios de pequeno porte, para rotinas ambulatoriais, de emergências e de triagem e finalmente para discriminar amostras negativas que poderão então ser testadas por testes mais sensíveis.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Desenvolvimento de um teste LTE a partir de reativos (anticorpo policlonal ou monoclonal, antígenos recombinantes ou tradicionais) totalmente produzidos na FIOCRUZ.
- Testes de eficiência do LTE em amostras de campo realizados por diferentes laboratórios.
- Utilização desta mesma plataforma tecnológica para desenvolvimento de testes LTE para o diagnóstico de outros vírus que causam gastroenterite como adenovírus e astrovírus.
- Estabelecimento desta plataforma tecnológica na FIOCRUZ, através de Biomanguinhos ou do Centro de Tecnologia em Saúde.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert MJ, Faruque AS, Faruque SM, et al: Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol* 1999; 11: 3458-3464.

Altindis M, Yavru S, Simsek A, Ozkul A, Ceri A, Koc H. Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination, ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis. *Indian Pediatr.* 2004; 41: 590-4.

Al-Yousif Y, Anderson J, Chard-Bergstrom C, Bustamante A, Muenzenberger M, Austin K, Kapil S. Evaluation of a latex agglutination kit (Virogen Rotatest) for detection of bovine rotavirus in fecal samples. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001; 8: 496-8.

Al-Yousif Y, Anderson J, Chard-Bergstrom C, Kapil S. Development, Characterization, and Diagnostic Applications of Monoclonal Antibodies against Bovine Rotavirus. *Clin Diagn Lab Immunology.* 2000; 7: 288-292.

Amer AA, el-Mougi M, Hughes J, el-Tayyeb S, el-Abhar A, el-Shafie A. Comparison of latex agglutination test with an ELISA to diagnose rotavirus-associated diarrhoea in infants and young children. *J Diarrhoeal Dis Res.* 1990; 8: 87-9.

Andreotti PE, Ludwig GV, Harwood-Peruski A, Tuite JJ, Morse SS, and Peruski LF. Immunoassay of infectious agents. *BioTechniques* 2003; 35: 850-859

Bangs LB. New developments in particle-based tests and immunoassays. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 1990; 2:188-93.

Beards GM and Bryden AS. Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay test for rotavirus antigen in faeces. *J Clin Pathol.* 1981; 34:1388-1391.

Beards GM, Campbell AD, Cottrell NR, Peiris JSM, Rees N, Sanders RC, Shirley JA, Wood HC, Flewett TH. Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. *J.Clin Microbiol.* 1984 19: 248-254.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet* 1973; ii:1281-1283.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet* 1974; ii:149-151.

Bishop RF. Natural History of human rotavirus infection. *Archives of Virology Supplement* 1996; 12: 119-28.

Brandt CD, Kim HW, Rodriguez WJ, Thomas L, Yolken RH, Arrobio JO, Kapikian AZ, Parrott RH, Chanock RM. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. *J Clin Microbiol.* 1981; 13: 976-981.

Brandt CDI, Arndt C, Evans G, Kim HW, Stallings EP, Rodriguez WJ, Parrott RH. Evaluation of a Latex Test for Rotavirus Detection. *J Clin Microb.* 1987; 25: 1800-1802.

Bryden AS, Davies HA, Thouless ME, Flewett TH. Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. *J. Med. Microbiol.* 1977; 10: 121-125.

Carducci A, Vannucchi R, Guidi M, Reali D, Ruschi MA. Human rotavirus detection in stool specimens using enzyme-linked immunosorbent assays and latex agglutination test. *Boll Ist Sieroter Milan*. 1988; 67: 241-4.

Cevenini R, Rumpianesi Mazzaracchio FR, Donati M, Falcieri E, Lazzari R. Evaluation of a new latex agglutination test for detecting human rotavirus in faeces. *J Infection*. 1983; 7: 130-133.

Chik HP, Shahrabadi WMS, Ince B. Diagnosis of Rotavirus Gastroenteritis by a Commercial Latex Agglutination Test. *J Clin Microb*. 1985; 22: 846-850.

Clementi M, Pauri P, Bagnarelli P, Carloni G, Calegari L. Diagnosis of human rotavirus infections: comparison of an electrophoretic method, a modified complement fixation test and electron microscopy for rotavirus detection. *Arch Virol*. 1981; 67: 341-344.

Conradie JD, Govender M, Visser L. ELISA solid phase: partial denaturation of coating antibody yields a more efficient solid phase. *J Immunol Methods*. 1983; 59: 289-299.

Dennehy PH, Brady RC, Halperin SA, Ward RL, Alvey JC, Fischer FH Jr, Innis BL, Rathfon H, Schuind A, De Vos B; North American Human Rotavirus Vaccine Study Group. Comparative evaluation of safety and immunogenicity of two dosages of an oral live attenuated human rotavirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J*. 2005; 24: 481-8.

Dennehy PH, Gauntlett DR, and Tente WE. Comparison of Nine Commercial Immunoassays for the Detection of Rotavirus in Fecal Specimens. *J Clin Microb*. 1988; 26: 1630-1634

Dezelic G, Dezelic N, Muic N, Pende B. Latex particle agglutination in the immunochemical system human serum albumin--anti-human serum albumin rabbit serum. *Eur. J. Biochem*. 1971a; 20: 553-60.

Dezelic G, Dezelic N, Telisman Z. The binding of human serum albumin by monodisperse polystyrene latex particles. *Eur. J. Biochem.* 1971b; 10: 575-81.

Doern GVL, Herrmann JE, Henderson P, Stobbs-Walro D, Perron DM, Blacklow NR. Detection of Rotavirus with a New Polyclonal Antibody Enzyme Immunoassay (Rotazyme II) and a Commercial Latex Agglutination Test (Rotalex): Comparison with a Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1986; 23: 226-229.

Ellis RW, Sobanski MA, Diagnostic particle agglutination using ultrasound: a new technology to rejuvenate old microbiological methods. *J. Med. Microbiol.* 2000; 49: 853-9.

Estes MK. Rotaviruses and their replication. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Field's Virology* 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 2002; 1625.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H, Woode GN, Bridger JC, Derrick JM. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet* 1974; 2: 61-3.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet* 1973; ii:1497.

Glass RI, Bresee JS, Parashar U, Turcios R, Fischer T, Jiang B, Widdowson MA, Gentsch J. Rotavirus vaccines: past, present, and future. *Arch Pediatr.* 2005; 12: 844-7.

Grauballe PC, Vestergaard BF, Meyling A, Genner J. Optimized enzyme-linked immunosorbent assay for detection of human and bovine rotavirus in stools: comparison with electron-microscopy, immunoelectro-osmophoresis and fluorescent antibody techniques. *J Med Virol.* 1981; 7: 29-40.

Gribnau TC, Leuvering JH, van Hell H. Particle-labelled immunoassays: a review. *J Chromatogr.* 1986; 11: 175-89.

Gusmão RHP, Mascarenhas JD'aP, Gabbay YB, Linhares AC. Nosocomial transmission of avian-like rotavirus strain among children in Belem, Brazil. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 1994; 12: 129-32.

Haikala OJ, Kokkonen JO, Leinonen MK, Nurmi T, Mantyarvi R, Sarkkinen H K. Rapid detection of rotavirus in stool by latex agglutination: comparison with radioimmunoassay and electron microscopy and clinical evaluation of the test. *J Med Virol.* 1983; 11: 91-97.

Hammond GW, Ahluwalia GS, Hazelton PR. Detection of human rotaviruses in fecal specimens by a commercial latex-agglutination test. *J Infect Dis.* 1984a; 149: 1021.

Hammond GW, Ahluwalia GS, Klisko B, Hazelton PR. Human rotavirus detection by counterimmunoelectrophoresis versus enzyme immunoassay and electron microscopy after direct ultracentrifugation. *J Clin Microbiol.* 1984b; 19: 439-441.

Harris CC, Yolken RH, Krokan H, Hsu IC. Ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay: application to detection of cholera toxin and rotavirus. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1979; 76: 5336-5339.

Hidalgo-Álvarez R, Galisteo-González F. The adsorption characteristics of immunoglobulins. *Heterogeneous Chem. Rev.* 1995; 2: 249 – 268.

Hoff G, Prevorsek M. United States Patent 4,003,988; 1977.

Hughes JH, Tuomari AV, Mann DR, Hamparian VV. Latex Immunoassay for Rapid Detection of Rotavirus. *J Clin Microb* 1984; 20: 441-447.

Hughes JH. Physical and chemical methods for enhancing rapid detection of viruses and other agents. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6: 150-75. Review.

Izquierdo MP, Martín-Molina A, Ramos J. A. Rus, L. Borque, Forcada J, Galisteo-González F. Amino, chloromethyl and acetal-functionalized latex particles for immunoassays: A comparative study. *J Immun Meth.* 2004; 287: 159 - 167.

Julkunen I, Savolainen J, Hautanen A, Hovi T. Detection of rotavirus in faecal specimens by enzyme immunoassay, latex agglutination and electron microscopy. *Scand J Infect Dis.* 1985; 17: 245-9.

Kalica AR, Purcell RH, Sereno MM, Wyatt RG, Kim HW, Chanock RM, Kapikian AZ. A microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of the human reoviruslike agent in stools. *J Immunol.* 1977; 118: 1275-1279.

Kapikian AZ, Kim HW, Wyatt RG et al: Reovirus-like agent in stools: association with infantile diarrhea and development of serologic tests. *Science* 1974; 15:1049

Kapikian AZ, Chanock RN. Rotaviruses. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Field's Virology* 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers 2002; 1657-1708.

Kapikian AZ, Cline W, Mebus CA, Wyatt RG, Kalica AR, James HD, Van Kirk D, Chanock RM, Kim HW. New complement-fixation test for the human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 1975; i: 1056-1070.

Kimura T. Immuno-electron microscopic study on the antigenicity of tubular structures associated with human rotavirus. *Infect Immun.* 1981; 33: 611-5.

Knisley CV, Bednarz-Prashad AJ, Pickering LK. Detection of Rotavirus in Stool Specimens with Monoclonal and Polyclonal Antibody-Based Assay Systems. *J Clin Microb.* 1986; 23: 897-900.

Kok TW and Burrell CJ. Comparison of Five Enzyme Immunoassays, Electron Microscopy and Latex Agglutination for Detection of Rotavirus in Fecal Specimens. *J Clin Microb.* 1989; 29: 364-366.

Li B, Clark HF, Gouvea V. Aminoacid sequence similarity of the VP7 protein of human rotavirus HCR3 to that of canine and feline rotaviruses. *Journal of General Virology*, 1994; 75: 215-9.

Lin TY, Chen CW. Overview of stability study designs. *J Biopharm Stat.* 2003; 13: 337-54.

Lipson SM, Zelinsky-Papez KA. Comparison of four latex agglutination (LA) and three enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for the detection of rotavirus in fecal specimens. *Am J Clin Pathol.* 1989; 92: 637-43.

Lorrot M, Bon F, Balay K, Marc E, Moulin F, Lebon P, Pothier P, Gendrel D. Rotavirus sero/genotypes in France and worldwide. *Arch Pediatr.* 2005; 12: 838-40.

Lukowicz G, Mounier M, Leboutet MJ, Denis F, Goudeau A. Evaluation of a new latex test for detecting human rotaviruses in feces. *Pathol Biol (Paris)* 1985; 33: 681-3.

Mathewson JJ, Winsor DK Jr, DuPont HL, Secor SL. Evaluation of assay systems for the detection of rotavirus in stool specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1989; 12: 139-41

Matson DO, O’Ryan ML, Jiang X, et al: Rotavirus, enteric adenoviruses, caliciviruses, astroviruses, and other viruses causing gastroenteritis, in *Spector*

S, Hodinka RJ, Young SA, (eds). *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. Washington DC, ASM Press, 2000:270-294.

Matsuno S, and Nagayoshi S. Quantitative estimation of infantile gastroenteritis virus antigens in stools by immune adherence hemagglutination test. *J Clin Microbiol.* 1978; 7: 310-311.

Matthews REF. The classification and nomenclature of viruses. *Intervirology* 1979; 11: 133-5.

Mattion NM, Cohen J, Estes MK. The rotavirus proteins. Kapikian AZ *Viral Infections of the gastrointestinal tract.* 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1994; 169-249.

Middleton PJ, Holdaway MD, Petric M, Szymanski MT, Tam JS. Solid-phase radioimmunoassay for the detection of rotavirus. *Infect Immun.* 1977; 16: 439-444.

Middleton PJ, Petric M, Hewitt CM, Szymanski MT, Tam TS JS. Counter-immunoelectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbi-group) antigen and antibody. *J Clin Pathol.* 1976; 29: 191-197.

Miotti PG, Viscidi RP, Eiden J, Cerny E, Yolken RH. Centrifugation-augmented solid-phase immunoassay (CASPIA) for the rapid diagnosis of infectious diseases. *J Infect Dis.* 1986; 154:301-8.

Miraballes-Martínez I, Martín-Rodríguez A, Hidalgo-Álvarez R. Chloroactivated latex particles for covalent coupling of antibodies. Application to immunoassays. *J Biomaterials Science, Polym Ed.* 1997; 8: 765 - 777.

Miraballes-Martínez I, Martín-Rodríguez A, Hidalgo-Álvarez R. Strategies to improve the colloidal stability and the reactivity of immunolabelled latex beads. *J Dispersion Sci Tech.* 1996; 17: 321 - 337.

Molina-Bolívar JA, Galisteo-González F, Hidalgo-Álvarez R. Latex immunoassays: Comparative studies on covalent and physical immobilization of antibodies. II IgG. *J Biomat Sci, Polym Ed.* 1998; 9: 1103 – 1113.

Molina-Bolívar JA, Galisteo-González F. Latex immunoagglutination assays. *J Macrom Science-Polymer Reviews* 2005; 45: 59 - 98.

Morinet F, Ferchal F, Colimon R, Perol Y. Comparison of six methods for detecting human rotavirus in stools. *Eur J Clin Microbiol.* 1984; 3: 136-40.

Nakagomi O, Nakagomi A, Suto T, Suzuki H, Kutsuzawa T, Tazawa F, Konno T, Ishida N. Detection of human rotavirus by reversed passive hemagglutination (RPHA) using antibody against a cultivable human rotavirus as compared with electron microscopy (EM) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Microbiol Immunol.* 1982; 26: 747-751.

Nicolaieff A, Obert G, van Regenmortel MHV. Detection of rotavirus by serological trapping on antibody coated electron microscope grids. *J. Clin. Microbiol.* 1980; 12: 101-104.

O’Ryan M, Pérez-Schael I, Mamani N, et al. Rotavirus-associated medical visits and hospitalizations in South America: a prospective study at three large sentinel hospitals. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 685-693.

Obert G, Gloeckler R, Burckard J, van Regenmortel MHV. Comparison of immunosorbent electron microscopy, enzyme immunoassay and counterimmunoelectrophoresis for detection of human rotavirus in stools. *J Virol Methods* 1981; 3: 99-107.

Ortega-Vinuesa JL, Bastos-González D, Hidalgo-Álvarez R. Comparative studies on physically adsorbed and chemically bound IgG to carboxylated latexes. II. *J Colloid Interface Sci.* 1995; 176: 240 - 247.

Ortega-Vinuesa JL, Bastos-Gonzalez D. A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2001; 12:379-408.

Pai CH, Shahrabadi MS, Ince B. Rapid diagnosis of rotavirus gastroenteritis by a commercial latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 1985; 22: 46-50.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glass RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:565-72.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Andrade ZP, Castro L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J Virol Methods.* 1985; 10: 21-28.

Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Barth OM, Suttmoller F, de Farias V, Vidal MN. Comparison of polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1983a; 78: 483-490.

Pinto GB, Hawkes P, Zabal O, Ulloa E, Lager IA, Weber EL, Schudel AA. Viral antibodies in bovine fetuses in Argentina. *Res Vet Sci.* 1993; 55: 385-8.

Raj P, Bhan MK, Prasad AK, Kumar R, Sazawal S, Bhandari N. Evaluation of a new latex agglutination kit for detection of human rotavirus in faecal specimens. *Indian J Med Res.* 1989; 89: 165-9

Rhodes MB, Stair EL, McCullough RA, McGill LD, Mebus LA. Comparison of results using electron microscope, immunodiffusion and fluorescent antibody analyses to detect rotavirus in diarrheic fecal samples of calves. *Can J Comp Med.* 1979; 43: 84-89.

Rubenstein AS, and Miller MF. Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopic procedures for detecting rotavirus. *J Clin Microbiol.* 1982; 15: 938-944.

Sambourg M, Goudeau A, Courant C, Pinon G, Denis F. Direct Appraisal of Latex Agglutination Testing, a Convenient Alternative to Enzyme Immunoassay for the Detection of Rotavirus in Childhood Gastroenteritis, by Comparison of Two Enzyme Immunoassays and Two Latex Tests. *J Clin Microb.* 1985; 21: 622-625.

Sanchez R, Munoz P, Catalan P, Fernandez-Baca V, Rodriguez-Creixems M, Bouza E. Evaluation of 2 fast methods for the detection of rotaviruses in fecal samples. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1993; 11: 314-6.

Sanekata T, and Okada H. Human rotavirus detection by agglutination of antibody-coated erythrocytes. *J Clin Microbiol.* 1983; 17: 1141-1147.

Sanekata T, Yoshida Y, and Oda K. Detection of rotavirus from faeces by reversed passive haemagglutination method. *J Clin Pathol.* 1979; 32: 963.

Sanekata T, Yoshida Y, and Okada H. Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination. *J Immunol Methods.* 1981; 41: 377-385.

Sarkkinen HK, Halonen PE, Arstila PP. Comparison of four-layer radioimmunoassay and electron microscopy for detection of human rotavirus. *J Med Virol.* 1979; 4: 255-260.

Sarkkinen HK, Tuokko H, Halonen PE. Comparison of enzyme-immunoassay and radioimmunoassay for detection of human rotaviruses and adenoviruses from stool specimens. *J Viro. Methods.* 1980; 1: 331-341.

Section 280.100, "Stability Requirements for Licensed In Vitro Diagnostic Products," Compliance Policy Guide (Rockville, MD: Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, 2000).

Sharp JM., and Littlejohns IR.. Detection of rotavirus infection by immunodiffusion. *Vet Microbiol.* 1981; 6: 31-39.

Singer JM, Plotz CM. The Latex Fixation Test. I. Application to the Serologic Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. *Am. J. Med.* 1956; 21: 888-892.

Skaug K, Figenschau KJ, Orstavik I. A rotavirus staphylococcal co-agglutination test. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect. B Microbiol.* 1983; 91: 175-178.

Smith TF, Wold AD, Espy MJ, Marshall WF. New developments in the diagnosis of viral diseases. *Infect Dis Clin North Am.* 1993; 7: 183-201. Review.

Sobanski MA, Ellis RW, Hastings JG. Rotavirus detection using ultrasound enhanced latex agglutination and turbidimetry. *J Immunoassay.* 2000; 21: 315-25.

Spence L, Fauvel M, Petro R, Block S. Comparison of counterimmunoelectrophoresis and electron microscopy for laboratory diagnosis of human reovirus-like agent-associated infantile gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 1977; 5: 248-249.

Stability Testing of In Vitro Diagnostic Reagents, EN 13640:2002 (Brussels: European Committee for Standardization, 2001).

Svensson L, Grandien M, Pettersson CA. Comparison of solid-phase immune electron microscopy by use of protein A with direct electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of rotavirus in stool. *J Clin Microbiol.* 1983; 18: 1244-1249.

Thomas EE, Roscoe DL, Book L, Bone B, Browne L, Mah V. The utility of latex agglutination assays in the diagnosis of pediatric viral gastroenteritis. *Am J Clin Pathol.* 1994; 101: 742-6.

Tijssen P, Adam A. Enzyme-linked immunosorbent assays and developments in techniques using latex beads. *Curr. Opin. Immunol.* 1991; 3: 233-7.

van Duynhoven YT, de Jager CM, Kortbeek LM, Vennema H, Koopmans MP, van Leusden F, van der Poel WH, van den Broek MJ; eXplosie Project Team. A one-year intensified study of outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands. *Epidemiol Infect.* 2005; 133: 9-21.

WHO. Report of the meeting on future directions for rotavirus vaccine research in developing countries. Geneva, 9–11 February, 2000. Geneva: World Health Organization; 2000 (unpublished document WHO/V&B/00.23; available from Vaccines and Biologicals, World Health Organization, CH-1211 Geneva 27, Switzerland and on the Internet at www.who.int/vaccines-documents/DocsPDF00/www531.pdf).

Widdowson MA, Bresee JS, Gentsch JR, Glass RI. Rotavirus disease and its prevention. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005; 21:26-31. Review.

Wilde J, Yolken R, Willoughby R, Eiden J. Improved detection of rotavirus shedding by polymerase chain reaction. *Lancet.* 1991; 337:323-6.

Wilhelmi I, Colomina J, Martin-Rodrigo D, Roman E, Sanchez-Fauquier A. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples compared with standard enzyme immunoassay and latex agglutination techniques. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001; 20: 741-3.

Xu L, Harbour D, McCrae MA. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. *J Virol Methods.* 1990; 27: 29-37.

Xu LC, Logan BE. Interaction forces between colloids and protein-coated surfaces measured using an atomic force microscope. *Environ Sci Technol.* 2005; 39: 3592-600.

Yanase N, Noguchi H, Asakura H, Suzuta T. Preparation of magnetic latex particles by emulsion polymerization of styrene in the presence of a ferrofluid. *J of Applied Polymer Science* 2003; 50: 765 – 776.

Yolken RH, Kim HW, Clem T, Wyatt RG, Kalica AR, Chanock RM, Kapikian AZ Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reoviruslike agent of infantile gastroenteritis. *Lancet* 1977; ii: 263-266.

Yolken RH, Leggiadro RJ. Immunoassays for the diagnosis of viral enteric pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1986; 4: 61S-69S.

Yolken RH. Enzyme immunoassays for the detection of infectious antigens in body fluids: current limitations and future prospects. *Rev Infect Dis.* 1982; 4: 35-68.

Yolken RH; Wilde JA. Assays for detecting human rotavirus. Kapikian AZ *Viral Infections of the gastrointestinal tract.* 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1994; 785.