

Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de proteínas não estruturais da Dengue.

Juliana Martins Machado^{1*}; Tatiana Aparecida de Oliveira¹; Antônio Phelipe Zóboli¹; Camila Magalhães Dias¹; Isaías Soares¹; Manoéle Alegiance Fernandes Pereira¹; Antônio Helvécio Tótola¹.

RESUMO

Atualmente o vírus do Dengue é considerado um dos principais problemas de saúde pública mundial. O vírus do Dengue possui três proteínas estruturais (capsídeo (C), proteínas precursoras de membrana (prM) ou de membrana (M) e do envelope (E), e sete proteínas não estruturais relacionadas com a infecção: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, que são importantes na replicação e virulência, sendo a NS1 comum aos quatro sorotipos. A técnica de testes imunocromatográficos, é baseada na utilização de tiras de um material suporte, impregnadas com reagentes secos que são ativadas pela aplicação de amostras fluidas. A utilização de anticorpos policlonais dos ovos de galinhas (IgY) tem sido empregada para a testes de detecção de antígenos devido a alta sensibilidade e ser um processo econômico. O trabalho teve por objetivo desenvolver ensaios imunocromatográficos para a detecção de proteínas NS1.

Palavras-chave: Dengue, NS1, IgY, Imunocromatografia.

INTRODUÇÃO

O vírus de dengue (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*, sendo considerada a mais importante arbovirose que afeta o homem em termos de morbidade e mortalidade. São quatro sorotipos denominados DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. A dengue é uma doença infecciosa, febril e aguda, e pode se apresentar como infecção inaparente, dengue clássico (DC), febre hemorrágica da dengue (FHD), síndrome do

choque de dengue (SCD) e dengue com complicação (DCC)^{1,2}.

Dentre as proteínas expressas pelo vírus da Dengue, destaca-se a NS1. Essa proteína é expressa na superfície das células infectadas e se encontra na circulação como uma substância solúvel, constituindo um excelente alvo para o diagnóstico da Dengue. O diagnóstico de Dengue pode ser realizado em dois momentos distintos: no estágio inicial, com a presença de febre e viremia acompanhados por altos níveis de NS1 no sangue dos pacientes e no estágio II, após o período febril até algumas semanas após infecção, quando os títulos de anticorpos IgM e IgG específicos para proteínas virais estão presentes em maiores concentrações^{2,3,4,5,6}.

A técnica de testes imunocromatográficos, é uma metodologia de detecção baseada na utilização de tiras de um material de suporte impregnadas com reagentes secos que são ativadas pela aplicação de amostras fluidas. Aplicações desta metodologia incluem testes para detecção de patógenos, drogas, hormônios e metabolitos presentes em amostras médicas, veterinárias, alimentos, análises ambientais e outros^{7, 8, 9}.

A utilização de anticorpos policlonais dos ovos de galinhas (IgY) tem sido empregada para a captura e detecção de antígenos devido a alta sensibilidade e por ser um processo econômico¹⁰. O objetivo deste trabalho foi desenvolver ensaios imunocromatográficos para a detecção da proteína NS1, utilizando-se IgY conjugada com ouro coloidal como reagente de detecção. Este se justifica por ser de encontro aos interesses públicos, uma vez que o desenvolvimento de reativos para teste de Dengue torna o diagnóstico da doença precoce, permitindo a instalação de tratamentos mais efetivos, a rápida localização de focos endêmicos e a prevenção da expansão destes focos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento dos testes e obtenção dos insumos, galinhas foram previamente imunizadas com antígenos NS1 produzidas em nosso

¹ Universidade Federal de São Del Rei – Laboratório de Biquímica Imunologia Celular e Molecular - 36420-000, Ouro Branco – MG – *julianam.m@hotmail.com

laboratório. Anticorpos IgY anti-NS1 foram extraídos a partir da gema dos ovos, purificados por meio de precipitação utilizando-se polietilenoglicol e dialisadas contra PBS. As concentrações de proteínas totais obtidas das amostras purificadas foram quantificadas por varredura na faixa de 400 a 650 nm em espectrofotômetro NanoVue®.

A validação do funcionamento dos anticorpos purificados foi realizada pelos métodos de ELISA e Dot Blotting.

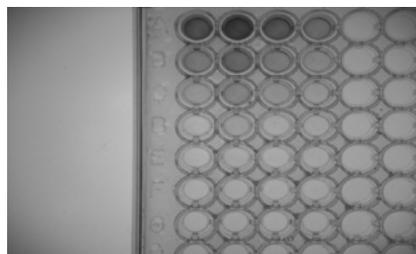
Os anticorpos obtidos foram conjugados com ouro coloidal (40 nm, OD1, Diagnostic Consulting Network®) e impregnadas em membranas fusion 5 e Millipore G041 (Diagnostic Consulting Network®).

Para desenvolvimento dos testes imunocromatográficos, a proteína recombinante NS1 foi imobilizada em membranas Whatman Millipore 125 e Whatman HF 180 (Diagnostic Consulting Network®), e os kits e testados com diferentes tampões de corrida. Os tampões utilizados foram: PBS, PBS tween 0,05% e Tris 100 mM pH 7,4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade de reconhecimento da NS1 pela IgY purificada foi confirmada pelo método de ELISA, onde a IgY atuava como o anticorpo primário e um anticorpo Anti-IgY conjugado com HRP como anticorpo secundário. Na figura 1 observamos o aparecimento de cor nos poços onde a reação foi positiva, indicando o reconhecimento da proteína NS1 pelos anticorpos IgY purificados.

Figura 1: Avaliação do reconhecimento do antígeno NS1 pela IgY anti-NS1 produzida em laboratório pela técnica de Elisa. Poços com coloração mais escura indicando resultados reagentes.



Para os ensaios imunocromatográficos, foram realizados vários experimentos com o objetivo de determinar a composição ótima das soluções e componentes utilizados no desenvolvimento dos mesmos. Nesta etapa foram analisadas as concentrações de anticorpos primário e secundário, quantidade de conjugado, de PBS/TRIS adicionados em cada corrida, sendo que o tampão TRIS apresentou melhores resultados que o PBS.

Alguns ensaios foram realizados empregando-se o conjugado desenvolvido no laboratório e membrana impregnada com NS1 de Kit comercial Dengue NS1 Bioclin® para verificar se o conjugado desenvolvido reconheceria outros tipos de NS1, apresentando resultados satisfatórios conforme figura 2:

Figura 2. Imunocromatografia reagente utilizando conjugado produzido em laboratório - IgY anti-NS1 conjugado com ouro coloidal - em membrana comercial Bioclin® impregnada com NS1, utilizando tampão de corrida Tris.



Outro ensaio realizado foi feito para avaliar a impregnação e funcionamento da NS1, utilizando-se o conjugado do Kit comercial Dengue NS1 Bioclin® e membrana preparada no laboratório, apresentado marcação satisfatória conforme figura 3:

Figura 3. Imunocromatografia reagente utilizando membrana impregnada com NS1 preparada no laboratório, frente ao conjugado comercial Bioclin®, utilizando tampão de corrida Tris.



CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que o sistema de detecção por imunocromatografia é uma alternativa promissora para o desenvolvimento de ensaios de diagnóstico para Dengue e outras infecções, portanto o método desenvolvido é capaz de detectar a presença de NS1. A técnica pode ser padronizada e validada para o desenvolvimento de kit diagnóstico para Dengue que tenha alta sensibilidade e especificidade, empregando-se biotecnologia nacional.

REFERÊNCIAS

- (1) BARREIRA, A. L., MACHADO, M. A., AQUINO, H.V., BRADA, J. S., FIGUEIREDO, T. M. L. Standardization and use of an immunoenzymatic method using infected cells as antigens in routine diagnosing of dengue. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 43(3):268-271, mai-jun, 2010.
- (2) SILVA, G.F., SILVA, S. J., ROCCO, M. I., **Evaluation of commercial kits for detecting the antigen NS1-dengue** – São Paulo. **Bepa** ;p.14-26, 2011.
- (3) SIQUEIRA, J. B., MARTELLI, JR., C. M. Dengue and dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002. **Emerg Infect Dis**, 11 (1),p.48-53. 2005.
- (4) WHO. **Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control**. 2nd ed. Geneva:World Health Organization; 1997.
- (5) ANGEL, B.; SAIRA, S. ; YOLANDA, T. A.; JUAN, C. M.; LEONEL, P.; SAMANTHA, N. H.; CRISANTA, R.; GUILLERMINA, K.;E. H.Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for dengue diagnosis and epidemiological studies. **Journal of Clinical Virology** 43 p. 287–291, 2008.
- (6) KULARATNE, S. A.; GAWARAMMANA, I. B.; KUMARASIRI, P. R. Epidemiology, clinical features, laboratory investigations and early diagnosis of dengue fever in adults: a descriptive study in Sri Lanka. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health** 36, p.686–692, 2005.
- (7) PINAR, Z.; IAN, B.; MILTON, T.; KIM, S.; HOOK, E. W. III Preliminary Evaluation of an Immunochromatographic Strip Test for Specific *Treponema pallidum* Antibodies. **Journal of clinical microbiology**, Aug., p. 3064–3065, 2002.
- (8) ANTHONY, R. S.; STEVEN, H. H. Evaluation of a new West Nile Virus lateral-flow rapid IgM assay. **Journal of Virological Methods** 157 p. 223–226, 2009.
- (9) REID, S.M., FERRIS, N.P., BRÜNING, A., HUTCHINGS, G.H., KOWALSKA, Z., ÅKERBLOM, L. Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-side detection of foot-and-mouth disease virus antigen. **J. Virol. Methods** 96, p.189–202, 2001.
- (10) VASCONCELOS, G. A. B. M. **Produção de anticorpos IgY específicos para o vírus da**

hepatite A purificados de gema de ovo de frangas imunizadas e sua possível aplicação em diagnóstico do vírus no fígado. Dissertação de mestrado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2010.