

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA
DETECÇÃO DE PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS DO DENGUE**

Camila Magalhães Dias

Orientador: Dr. Antônio Helvécio Tótola.

Ouro Branco
Dezembro/2014

DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS DO DENGUE

Camila Magalhães Dias

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado em
cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos da
Universidade Federal de São João Del-Rei.

Orientador: Dr. Antônio Helvécio Tótola.

Ouro Branco
Dezembro/2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

**DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOCROMATOGRAFICO PARA
DETECÇÃO DE PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS DO DENGUE**

Camila Magalhães Dias

A Banca Examinadora, composta pelos membros abaixo, avaliou este TCC:

Dr. Antônio Helvécio Tótola.

Dr. Sandra de Cássia Dias

Dr. Enio Nazaré de Oliveira Júnior

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 A DENGUE.....	10
1.2 DENGUE VÍRUS.....	11
1.3 DIAGNÓSTICO.....	13
1.4 IMUNOGLOBULINAS Y	16
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 IMUNIZAÇÃO	20
3.2 PURIFICAÇÃO DE IgY	20
3.3 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS IgY	21
3.3.1 Quantificação de IgY por Espectrofotometria	21
3.3.2 Caracterização por Eletroforese.....	21
3.3.3 Detecção por <i>Dot Blotting</i>	22
3.4 CONJUGAÇÃO COM OURO COLOIDAL	22
3.5 TESTES IMUNOCROMATÓGRAFICOS.....	23
3.5.1 Impregnação e bloqueio das membranas de Análise	23
3.5.2 Montagem dos testes imunocromatográficos	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 PURIFICAÇÃO DE IgY	25
4.1.1 Quantificação de IgY por Espectrofotometria	25

4.1.2	Caracterização por Eletroforese	26
4.1.3	Detecção por <i>Dot Blotting</i>	27
4.2	CONJUGAÇÃO COM OURO COLOIDAL	27
4.3	TESTES IMUNOCROMATÓGRAFICOS.....	28
4.3.1	Impregnação e bloqueio das membranas de Análise	28
4.3.2	Montagem dos testes imunocromatográficos	29
5.	CONCLUSÃO	31
6.	BIBLIOGRAFIA.....	32

RESUMO

Atualmente o vírus do Dengue é considerado um dos principais problemas de saúde pública mundial. O vírus do Dengue possui 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 captura de antígenos devido a alta sensibilidade e por ser um processo econômico. O projeto teve por objetivo desenvolver ensaios imunocromatográficos para a detecção de proteína NS1, presente no sangue dos pacientes infectados. Desenvolveram-se os ensaios imunizando galinhas com o antígeno NS1, e os anticorpos IgY anti-NS1 foram obtidos a partir da gema do ovo, purificados por meio de precipitação utilizando PEG 6000, e posteriormente dialisadas. Quantificou-se os IgY por varredura na faixa de 400 a 650 nm em NanoVue[®]. Analisou-se o funcionamento do anticorpo purificado pelos métodos de ELISA e *Dot Blotting*. Conjugou-se IgY anti-NS1 com ouro coloidal (40 nm, OD1, Diagnostic Consulting Network[®]) e impregnou-se em membranas Fusion 5 e Millipore G041 (Diagnostic Consulting Network[®]). As membranas AE98, HF180 e MP125 (Diagnostic Consulting Network[®]) foram impregnadas com NS1. Os kits foram montados e testados em diferentes condições, os tampões utilizados foram PBS, PBS tween 0,05% e Tris 100 µM pH 7,4. Obteve-se resultados positivos com o aparecimento de cor para os testes de *ELISA*, *Dot Blotting*, conjugação, impregnação. Também houve aparecimento de marcação nas áreas impregnadas para testes de corridas dos kits desenvolvidos, sendo dois deles com resultados mais satisfatórios. Portanto, a partir dos resultados obtidos conclui-se que o método desenvolvido foi capaz de detectar a presença de NS1 e pode ser utilizado: para padronizar a técnica, dar continuidade ao projeto e desenvolver um kit confiável e de qualidade com tecnologia nacional.

Palavras-Chave: Dengue, NS1, IgY, Purificação, Imunocromatografia.

ABSTACT

Currently the virus Dengue is considered one of the main problems of global public health. Dengue virus has seven non-structural proteins related to infection: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5, which are important in virulence and replication, NS1 being common to all four serotypes. The immunochromatographic test technique is based on the use of strips of a support material impregnated with dried reagents that are activated by application of fluid samples. The use of polyclonal antibodies from chicken eggs (IgY) has been used for capture of antigens due to high sensitivity and to be an economic process. The project aimed to develop immunochromatographic assays for the detection of NS1 proteins present in the blood of infected patients. The assays were developed by immunizing chickens with NS1 antigen and antibodies IgY anti-NS1, derived from egg yolk, were purified by precipitation using PEG 6000, and subsequently dialyzed. It is quantitated by scanning the IgY the range of 400 to 650 nm in NanoVue[®]. We analyzed the operation of the purified antibody by ELISA methods and Dot Blotting. Was coupled-IgY anti-NS1 with colloidal gold (40 nm, OD1, Diagnostic Consulting Network[®]) and was imbued in membranes: fusion 5 and Millipore G041 (Diagnostic Consulting Network[®]). The membranes AE98, HF180 and MP125 (Diagnostic Consulting Network[®]) were impregnated with NS1. The kit have been assembled and tested under different conditions, the buffers used were PBS, PBS Tween 0,05% and Tris 100 μ M pH 7,4. Positive results were obtained with the appearance of color for ELISA tests Dot Blotting, conjugation and impregnation. There was also the appearance of marking areas impregnated for running tests developed kits, two of them with more satisfactory results. Therefore, from the results obtained it is concluded that the proposed method is able to detect the presence of NS1 and can be used to standardize the technique, to maintain the project and developing a reliable quality with national technology kit.

Keywords: Dengue, NS1, IgY, Purification, Immunochromatography.

1. INTRODUÇÃO

1.1 A DENGUE

Atualmente o vírus da Dengue é considerado um dos principais problemas da saúde pública mundial, sobretudo nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Também é tido como o mais importante arbovírus, em termos de morbidade e mortalidade, que afeta o homem (GUBLER, 1995; PINHEIRO, 1997; GUHA-SAPIR, 2005).

O mundo moderno apresenta condições favoráveis socioambientais para uma rápida expansão dos vetores do vírus, principalmente o mosquito *Aedes aegypti* (Figura 1) o que fez com que se espalhasse por uma área onde vivem cerca de 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectam anualmente, em mais de 100 países, sendo que os surtos ocorrem durante ou logo após os períodos chuvosos (KOW, 2001; CAMARA, 2007; LEONG, 2007).



Figura 1. Mosquito *Aedes aegypti*, vetor do vírus da Dengue.

Fonte. Ministério da Saúde – Decit 2006.

O *Aedes aegypti* é um mosquito de hábitos domésticos e diurnos que utiliza a água limpa acumulada em recipientes para deposição dos ovos. Os mosquitos apresentam ampla capacidade de adaptação às situações ambientais desfavoráveis e os ovos depositados são capazes a resistir a altos níveis de dessecação. Um dos fatores relacionados à alta disseminação do vetor são o acelerado crescimento populacional e a urbanização desordenada. Esses fatores causam uma má distribuição da renda, fazendo com que cada vez mais pessoas vivam em regiões onde o abastecimento de água, a rede de esgoto e a coleta de lixo são precárias, ou ainda, são inexistentes. Sem o fornecimento contínuo de água, a população se vê obrigada a estocar água em depósitos domésticos, gerando diversos criadouros para o *Aedes*. Assim como o abastecimento, as precárias coletas de lixo também geram um aumento de criadouros para o mosquito, já que há um acúmulo de lixo em áreas peridomiciliares (CLARO, 2004).

No Brasil as condições socioambientais são propícias para a disseminação do mosquito e, conseqüentemente, o número de casos da doença é elevado, atingindo milhares de brasileiros todos os anos. Segundo dados divulgados pelo governo federal, anualmente são gastos cerca de 533 milhões de reais para o combate da doença. Neste cenário epidemiológico, torna-se indispensável à disponibilidade de produtos que apresentem desempenhos satisfatórios para a realização dos testes clínicos laboratoriais, rastreamento e confirmação da presença do vírus em caso de epidemias (SIQUEIRA, 2005).

1.2 DENGUE VÍRUS

O Dengue vírus (DENV) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e transmite-se ao homem através da picada de mosquitos hematófagos fêmeas de gênero *Aedes*, particularmente o *Aedes Aegypti* (*Ae. Aegypti*). Atualmente são conhecidos quatro sorotipos do vírus da Dengue, denominados como DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sendo que a infecção pode ocorrer a partir de qualquer um dos quatro sorotipos. Caso o paciente seja infectado por qualquer um dos quatro sorotipos pela segunda vez, a doença se desenvolve em uma forma mais grave, chamada de febre hemorrágica (BURKE, 2001; LINDENBACH, 2001).

Na Figura 2, pode-se observar uma imagem de microscopia eletrônica contendo células do *Aedes aegypti* infectadas com o vírus do dengue.

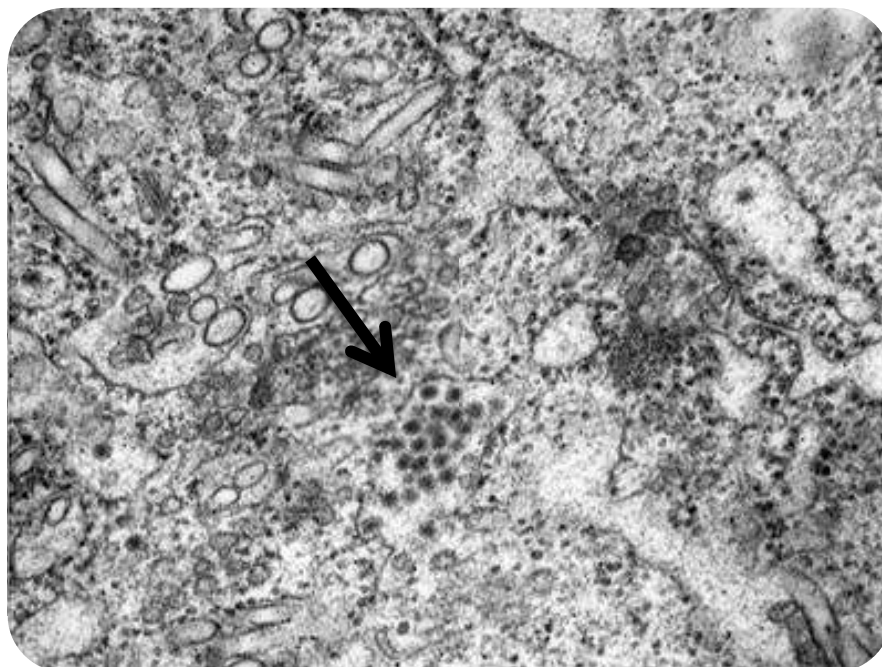


Figura 2. A imagem, produzida por microscopia eletrônica, contendo células do mosquito *A. aegypti* infectadas pelo vírus da dengue (pontos pretos). Fonte. Instituto Oswaldo Cruz.

O vírus do dengue é composto por uma fita única de ácido ribonucleico, com polaridade positiva contendo aproximadamente 11 Kb. O genoma possui uma única sequência de leitura aberta que codifica a formação das inúmeras proteínas virais, sendo flanqueada por duas regiões não codificantes 3' UTR e 5' UTR, que são importantes para a regulação e expressão do vírus. A sequência genômica codifica três proteínas estruturais e sete proteínas não estruturais que são: proteína do capsídeo (C), proteínas do envelope (E) e proteínas de membrana (M). As proteínas não estruturais (Figura 3) são: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, e são responsáveis pelas atividades reguladoras e de expressão do vírus, incluindo replicação, virulência e patogenicidade. Um importante alvo dos anticorpos para DENV é a proteína NS1, uma glicoproteína conservada que parece ser essencial para a variabilidade do vírus, sendo expressa na superfície das células infectadas e se encontra na circulação como uma substância solúvel (SILVA, 2011; NUNES, 2011; ACOSTA-BAS, 2005; ARTIMOS, 1999).

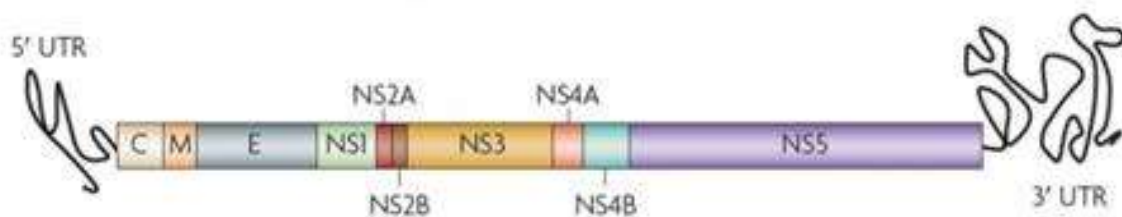


Figura 3. Desenho esquemático da fita única de ácido ribonucleico do vírus do Dengue, com suas proteínas estruturais e não estruturais. Fonte: Mayo Clinic (Mayo Medical Laboratories).

1.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da Dengue é difícil quando se baseia apenas nos aspectos clínicos, uma vez que os sintomas podem ser confundidos com outras doenças. O diagnóstico específico se dá por meio do isolamento viral, detecção do antígeno, detecção do ácido nucleico viral ou pesquisa de anticorpos. No entanto, buscam-se alternativas para o diagnóstico visando à minimização do tempo e custos (ROLIM, 2005).

O diagnóstico da Dengue pode ser realizado em dois momentos distintos: no estágio I e no estágio II. No estágio I há a presença da febre e da viremia e são acompanhadas por altos níveis de proteínas não estruturais no sangue dos pacientes. Já no estágio II, algumas semanas após a infecção e o período febril, os títulos de anticorpos IgM e IgG específicos para as proteínas virais estão presentes em maiores concentrações. A detecção dos anticorpos IgM é detectável em pacientes com infecção primária dentro de 2 dias, normalmente ocorre após a diminuição da viremia e da febre, atingindo um pico em duas semanas. Os níveis de IgG nas infecções primárias são baixos, sendo maior nas infecções secundárias. A evolução dos níveis de viremia, IgM e IgG nas infecções primárias e secundárias, podem ser observadas na Figura 4 (ROMANOS, 2008; BALMASEDA, 2008; MIZUNO, 2007; KULARATNE, 2005; ROLIM, 2005; BALMASEDA, 2003; HARRIS, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997; KUNO, 1991; FERNANDEZ, 1990).

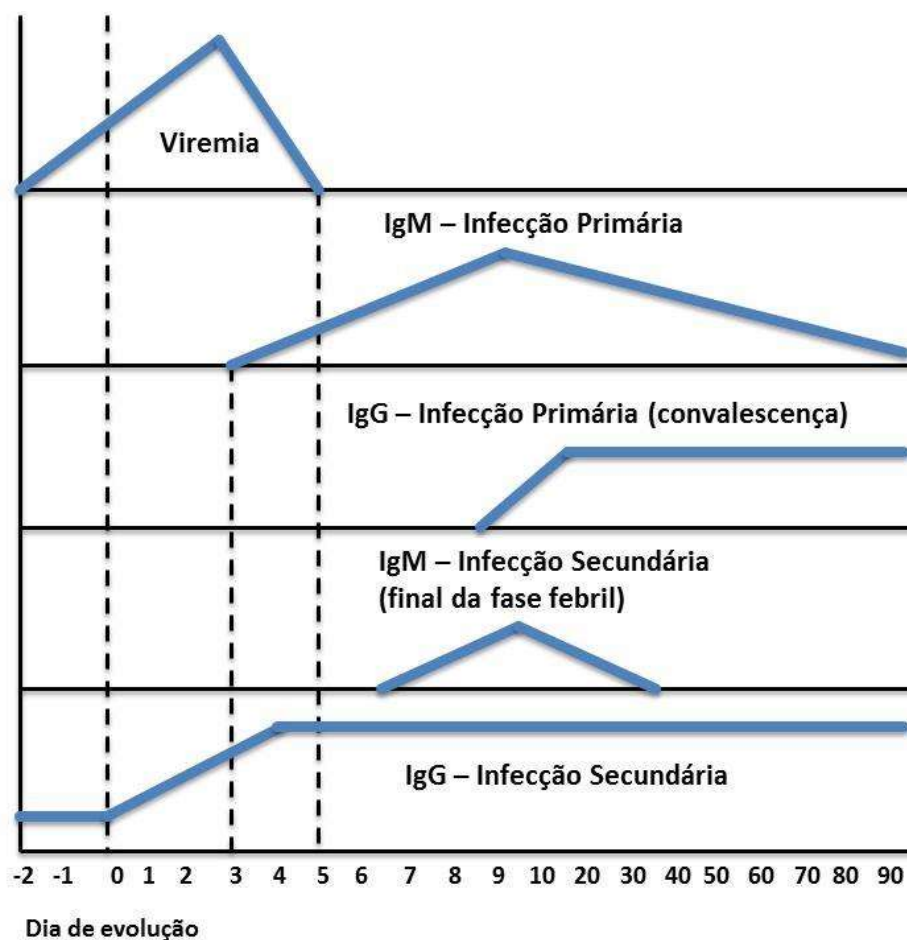


Figura 4. Resposta Antígeno-Anticorpo contra a infecção pelo vírus do Dengue.

Fonte. Franceschi Medicina Diagnóstica (AMD). – Modificado.

O ensaio de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*, é frequentemente utilizado para confirmação do diagnóstico do Dengue, detectando anticorpos do tipo IgM ou IgG ou ainda para a detecção das proteínas NS1 em amostras coletadas uma semana após o início dos sintomas. Trata-se de uma análise "*a posteriori*" limitada para o diagnóstico rápido em doentes durante o início da fase sintomática. Os testes estão disponíveis nos laboratórios centrais do país, sendo o *ELISA* IgM utilizado para indicar infecções primárias e o *ELISA* IgG para indicar as infecções secundárias (CHINNAWIROTPISAN, 2008; TRAN , 2006; RUANGTURAKIT, 1994).

O teste imunoenzimático para captura de imunoglobulina IgM, mais conhecido como *MAC-ELISA* tem sido uma valiosa ferramenta para a vigilância da Dengue e da febre hemorrágica da Dengue. Durante epidemias, esse teste possui a vantagem de diagnosticar rapidamente a propagação da transmissão da doença. Em geral, no *MAC-ELISA* ocorrem

reações cruzadas com todos os sorotipos do Dengue e de outros flavivírus, tais como os da encefalite japonesa, encefalite St. Louis e o da febre amarela. Por apresentar ótima sensibilidade em detectar anticorpos IgM, esta técnica tem sido muito usada na fase aguda, porque tais anticorpos se tornam detectáveis em até 5 a 10 dias depois da manifestação da doença (ABBASI, 2009; BLACKSELL, 2008; LAPPHRA, 2008; KUMARASAMY, 2007; DUSSART, 2006; SHU, 2004; ALCON, 2002; YOUNG, 2000; VORDAM, 1997).

A utilização dos conhecimentos da biologia molecular proporcionou o aparecimento de novas tecnologias associadas à detecção quantitativa e análise qualitativa de patógenos humanos em animais (ALLICE, 2007; ALFARESI, 2007; LEVI, 2007; SAMPATH, 2007, SANDRES-SAUNÉ, 2007; KINAI, 2007; GIRALDI, 2006; PINAR, 2002).

Os sintomas iniciais da infecção pelo vírus dengue são inespecíficos, e o diagnóstico diferencial é feito para diversas doenças, tais como: influenza, enterovirose, doenças exantemáticas (sarampo, rubéola, parvovirose e mononucleose infecciosa), hepatites virais, hantavirose, febre amarela, malária, riquetsioses, alergias cutâneas e outras infecções que possam ser epidêmicas na região de ocorrência do caso. A utilização de um teste rápido e sensível baseado no princípio imunocromatográfico, para detecção da proteína não estrutural NS1 é uma alternativa extremamente interessante para auxiliar o diagnóstico da dengue (SULUSHASH, 2009).

A técnica de teste imunocromatográfico, originalmente chamada de imunoensaio de partículas sol (SPIA) é uma metodologia de detecção baseada na utilização de tiras de um material suporte, impregnadas com reagentes secos que são ativadas pela aplicação de amostras fluidas. Um sistema típico de ensaio imunocromatográfico consiste de uma membrana, sobre a qual está situada uma pequena porção de material absorvente (usualmente sílica) que irá receber a amostra contendo um conjugado, o qual após reagir com a substância de interesse irá migrar através da membrana até alcançar uma região de detecção, contendo partículas conjugadas a um sistema de detecção, com tamanho variando de 15 a 800 nm, feitas usualmente de ouro coloidal, látex ou ainda selênio ou carbono. Partículas de látex podem ser coloridas ou ainda conjugadas com sondas fluorescentes, aumentando a sensibilidade dos ensaios, o esquema do teste pode ser observado na Figura 5. Aplicações desta metodologia incluem testes para detecção de patógenos, drogas, hormônios e metabólitos presentes em amostras médicas, veterinárias, alimentos, análises ambientais e outros (ANTHONY, 2009; SHANGJIN, 2008; REID, 2001; BRANCH, 1999; BRÜNING, 1999).

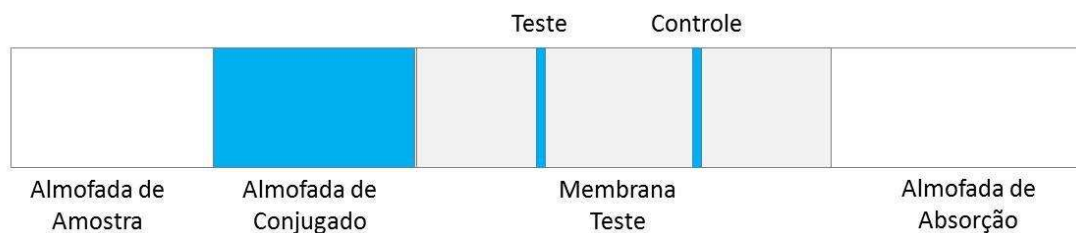


Figura 5. Esquema do teste imunocromatográfico de fluxo lateral.

1.4 IMUNOGLOBULINAS Y

Para o desenvolvimento dos testes de imunodeteção muitos pesquisadores têm utilizados os anticorpos policlonais IgY para a captura dos antígenos devido à alta sensibilidade. As IgY, nome originário de “yolk” (gema), são produzidas pelas aves e se encontram predominantemente na gema do ovo. A princípio esses anticorpos eram chamados de IgG, mas estudos mostraram que designá-los desta forma era inadequado, pois existem significativas diferenças estruturais entre eles. Funcionalmente, os anticorpos IgY são equivalentes à IgG dos mamíferos, mas as galinhas também produzem anticorpos das classes IgM e IgA, ambas presentes na clara do ovo (VASCONCELOS, 2010).

Atualmente não há um consenso com relação a massa molar das IgY, mas ficou estabelecido que sua massa é de aproximadamente 180 a 200 KDa, enquanto a IgG possui em média de 160 KDa. Outra diferença entre elas está na cadeia leve da IgY que é considerada mais leve que a da IgG (em média 25 KDa) e na sua cadeia pesada que é considerada mais pesada que a da IgG (em média 55 KDa). Além da massa molar, essas duas moléculas se distinguem em uma ligação de dissulfeto entre a cadeia pesada variável e a cadeia pesada constante presente apenas na IgG. Essa ligação confere maior estabilidade em sua estrutura, porém reduz sua flexibilidade. A Figura 6 é possível ver também que a IgY possui quatro cadeias carbônicas ligadas na lateral da cadeia pesada constante, enquanto a IgG possui apenas duas dessas cadeias (ARAÚJO, 2007; FISCHER, 1996).

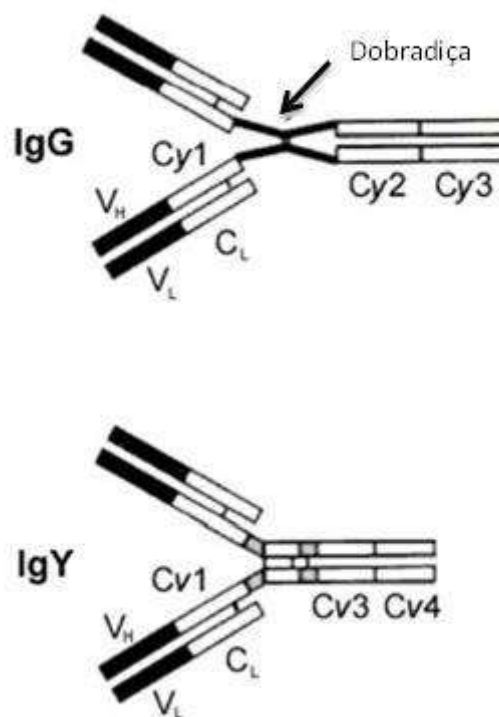


Figura 6. Comparação estrutural entre IgG e IgY.
Fonte: ARAÚJO, 2007.

A produção e purificação de IgY a partir de ovos de galinhas tem atraído a atenção dos pesquisadores devido às vantagens de utilização dessa imunoglobulina em relação a IgG. Devido à distância genética entre os mamíferos e as aves, quando os antígenos de mamíferos são inoculados nas aves geram uma resposta mais forte e com maior afinidade. A quantidade de anticorpos obtidos por ovo é expressivamente maior, e há uma redução no número de animais utilizados. As galinhas poedeiras acumulam altos níveis de IgY, de acordo com Shin (2002, apud Fischer *et al.*, 1994) estima-se que 1mL de gema de ovo contenha 9,4mg de IgY e cada ovo, aproximadamente 10mL de gema. Supondo que uma ave coloque 20 ovos por mês, e aproximadamente 240 ovos (2.400mL de gema de ovo) por ano, portanto, uma ave imunizada teria um rendimento de aproximadamente 23g de IgY por ano (ARAÚJO, 2007).

As aves têm capacidade de transferir anticorpos maternos do soro para a gema do ovo com o objetivo de conferir imunidade passiva para o embrião e neonato. Outro fator favorável da utilização da tecnologia de IgY é o bem estar do animal. A obtenção desse tipo de anticorpo é natural, menos invasiva o que reduz o sofrimento dos animais, diferentemente do que ocorre na coleta em mamíferos, pois somente a coleta dos ovos é necessária após a

imunização, o isolamento da IgY é rápido e simples, pequenas quantidades de antígeno são requeridas para obter altos e duradouros títulos de IgY da gema do ovo de aves imunizadas, e a manutenção das aves é um processo mais econômico (SCHADE, 2005; TINI, 2002; MURATA, 1996; HATTA, 1993; GASSMANN, 1990; GOTTSTEIN, 1985).

Os lipídeos, a água e as proteínas são os três constituintes majoritários da gema do ovo, onde as IgY são encontradas. A água corresponde a aproximadamente 50% da composição, os lipídeos correspondem a 33% e as proteínas a 15-17%. Quando a gema do ovo é centrifugada há a formação de duas frações, uma das frações é chamada de granular e a outra de plasma. A fração granular é composta por aproximadamente 70% de lipoproteínas de alta densidade, 12% de lipoproteínas de baixa densidade e 22% das proteínas totais. O plasma é composto 78% das proteínas totais, sendo 86% de lipoproteínas de baixa densidade e 14% de glicoproteínas globulares livres de lipídeos (LEE, 2000).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi desenvolver ensaios imunocromatográficos para a detecção de proteínas não estruturais NS1, presentes no sangue dos pacientes infectados. O desenvolvimento de reativos para Dengue vem de encontro aos interesses públicos, uma vez que o diagnóstico precoce da doença, bem como a caracterização da gravidade da mesma permite a instalação de um tratamento mais efetivo, rápida localização de focos endêmicos e a prevenção da expansão destes focos. No mercado nacional as empresas que oferecem produtos similares trabalham com tecnologia estrangeira.

A criação de ensaios imunocromatográficos para detecção da proteína viral NS1, com reativos de tecnologia nacional permitirá a diminuição dos custos e, conseqüentemente, viabilizará a oferta destes com preços mais acessíveis aos observados no nosso país.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e purificar de anticorpos anti-NS1.
- Produzir conjugados de anticorpos.
- Confeccionar kits para detecção da proteína NS1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 IMUNIZAÇÃO

A imunização das galinhas foi realizada injetando 200 µg de antígeno NS1 diluído na proporção de 1:1 com adjuvante completo de Freund no músculo peitoral. Com intervalos de 21 dias, aplicaram-se mais dois reforços da imunização, utilizando 100 µL do antígeno NS1 em adjuvante incompleto de Freund diluído na proporção de 1:1.

A utilização das galinhas foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA - UFSJ no dia 31 de outubro de 2012.

3.2 PURIFICAÇÃO DE IgY

Com os ovos coletados desde a primeira postura purificou-se as IgY empregando o método modificado de precipitação em polietilenoglicol (PEG) descrito por Pauly et al., procedimento que possui três etapas de precipitação da gema com PEG 6000. A purificação inicia separando-se a clara da gema e vertendo o conteúdo da gema em um tubo falcon. É adicionada à gema na proporção de 2:1 uma solução contendo Tampão Salino Fosfato (PBS) e 5,2% (M/V) de PEG 6000. A mistura é homogeneizada, incubada por 10 minutos a temperatura ambiente sob agitação mecânica e centrifugada a 4°C por 20 minutos a 2500 x g. Nessa etapa do procedimento de purificação, a suspensão é separada em duas fases, uma fase que consiste em particulados da gema e substâncias lipídicas, essa é a fase mais densa e deve ser descartada e uma fase aquosa contendo proteínas, dentre elas a IgY.

Filtrou-se a fase líquida com um pedaço de algodão e adiciona-se 1:4 uma solução contendo PBS e 42,5% (M/V) de PEG 6000. A mistura é homogeneizada, incubada e centrifugada utilizando a condição descrita acima. Nessa etapa o sobrenadante deve ser descartado, já que a proteína de interesse encontra-se no pellet. Solubilizou-se cuidadosamente o pellet em 5 mL de PBS com 24% (M/V) de PEG 6000, incubou-se e novamente, centrifugou-se. Por fim solubilizou-se o pellet em 5 mL de PBS.

A solução de IgY foi dialisada utilizando uma membrana com poros que permitem a passagem de moléculas com tamanho de 12-14,000 KDa, dessa forma todos os resíduos de PEG 6000 e sais remanescentes são eliminados. A diálise foi realizada inicialmente contra uma solução de NaCl 1M e posteriormente contra uma solução de PBS pH 7,4 sob refrigeração à 4°C e agitação magnética por 12 horas.

3.3 QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS IgY

3.3.1 Quantificação de IgY por Espectrofotometria

Para determinar a concentração de IgY purificada, utilizou a espectrofotometria, onde a concentração do produto purificado foi estimada no espectrofotômetro NanoVue[®] utilizando uma programação do aparelho. Essa programação utiliza o coeficiente de extinção molar de IgG, em comprimento de onda de 280 nm, uma vez que as estruturas são similares e apresentam um coeficiente de extinção molar similar. A concentração fornecida pelo aparelho se refere à concentração total das proteínas presentes no purificado da gema, não somente a IgY.

3.3.2 Caracterização por Eletroforese

A eletroforese foi realizada utilizando um gel de poliacrilamida na presença de Lauril-Sulfato de Sódio (SDS-PAGE) a 10% (M/V), onde a amostra de IgY desnaturada por 5 minutos a 95°C em um tampão de desnaturação contendo dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 4%; glicerol 20%, β -mercaptoetanol 12 %, Tris 50 mM, pH 6,8, azul de Bromofenol 0,05% e um padrão de massa molar de 260-10 kDa (EspectraTM Multicolor, Fermentas[®]) foram aplicados nas canaletas e submetidos a uma corrente de 90mA. Em seguida corou o gel com uma solução de Comassie Blue 1% para visualizar as bandas apresentadas.

3.3.3 Detecção por *Dot Blotting*

A detecção da capacidade de reconhecimento da especificidade da IgY foi realizada através da ligação do anticorpo em uma membrana de nitrocelulose impregnada com NS1 previamente preparada.

Realizou-se a impregnação da membrana aplicando pontos contendo 2 μ L de proteína NS1 recombinante na concentração de 1mg/mL na membrana ativada em metanol por 15 segundos. Secou-se a membrana por uma hora em estufa a 37°C. Depois de seca a membrana foi cortada de forma que cada pedaço contenha um ponto de proteína impregnada. Para evitar a ligação inespecífica, bloqueou a membrana por 1 hora sob agitação mecânica à temperatura ambiente em PBS pH 7,4 5% de albumina 0,05% de tween. Terminado o tempo de bloqueio, a membrana foi lavada 3x por 5 minutos com PBS 0,05% de tween.

Aplicou-se sobre as membranas uma solução contendo a IgY purificada diluída na proporção de 1:250 em solução de PBS 5% de albumina 0,05% de tween. Incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação mecânica. A membrana foi novamente lavada 3x por 5 minutos com PBS 0,05% de tween.

Adicionou-se anticorpo Anti-IgY conjugado com peroxidase de rabanete (HRP) diluído na proporção de 1:5000 em solução de PBS 5% de albumina 0,05% de tween. Incubou novamente por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação mecânica, e lavou-se 3x por 5 minutos com PBS 0,05% de tween.

No final da última incubação, preparou-se o reagente de revelação adicionando 3,3'-Diaminobenzidina em 40 μ L peróxido de hidrogênio a 10% a um volume final de 15 mL de solução tampão Tris-NaCl (50 mM de Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,6). Terminadas as lavagens da solução de Anti-IgY, aplicou-se o reagente de revelação sobre a membrana. Após o aparecimento de cor, interrompeu-se a reação adicionando água ultra pura.

3.4 CONJUGAÇÃO COM OURO COLOIDAL

Confirmada a presença das IgY e sua capacidade de reconhecer as proteínas NS1, conjugou-se as soluções purificadas com ouro coloidal (40 nm, Densidade Ótica 1, Diagnostic

Consulting Network[®]) nos pHs 7,0 e 8,0. Em seguida foi realizada a leitura no espectrofotômetro na faixa de 400 a 650 nm.

O anticorpo conjugado foi ativado adicionando 10% de sacarose e 5% de trealose e aplicado em dois tipos de membranas, a Fusion5 e a Millipore G041 (Diagnostic Consulting Network[®]). As membranas foram mantidas na estufa a 37°C por aproximadamente 2 horas para ficarem secas. Todo o anticorpo conjugado foi aplicado nas membranas para garantir sua estabilidade permitindo seu armazenamento por períodos mais longos.

3.5 TESTES IMUNOCROMATÓGRAFICOS

3.5.1 Impregnação e bloqueio das membranas de Análise

Para dar início a montagem dos kits, teste sobre as melhores condições de impregnação de NS1 foram realizados ensaios alterando as condições de bloqueio. Impregnou-se as membranas Whatman AE98 e Millipore 125 (Diagnostic Consulting Network[®]) com a proteína NS1 na concentração de 500 ng/mL. Deixou-se secar na estufa por uma hora a 37 °C, em seguida foi realizado o bloqueio da membrana com uma solução de PBS tween 0,05% albumina 5% ou PBS tween 0,05% leite desnatado 5%, com leve agitação por 1 hora. Terminada a incubação, lavou-se as membranas 3x com PBS tween 0,05%, sendo cada lavagem mantida sob leve agitação por 10 minutos. Por fim, as membranas permaneceram na estufa a 37°C até ficarem completamente secas.

3.5.2 Montagem dos testes imunocromatográficos

Os kits foram montados em uma lâmina base adesiva, onde no centro foi colocada a membrana impregnada com NSI e acima almofada de absorção. Abaixo da membrana colocou-se a almofada de conjugado, membrana que contém a IgY conjugada em ouro coloidal e em baixo a almofada de amostra. Todas as membranas devem ter uma parte

sobrepostas a outra, com o objetivo de garantir uma boa corrida do tampão, pois o mesmo migra por capilaridade. Na Figura 7, pode-se observar como os kits foram montados.

Os Kits foram elaborados variando as membranas Whatman Prima 125[®], Millipore AE98[®] e Whatman HF 180[®] impregnadas com o antígeno NS1; e as membranas Fusion 5 e Millipore G041 impregnadas com o IgY Anti-NS1 cojugado com ouro coloidal e então testou-se os kits com dois tampões de corrida, PBS tween 0,05% e Tris 100 μ M pH 7,5.



Figura 7. Modelo de montagem dos testes imunocromatográficos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PURIFICAÇÃO DE IgY

4.1.1 Quantificação de IgY por Espectrofotometria

As concentrações de estimadas de IgY purificadas de 25 amostras podem ser observadas na Figura 8.

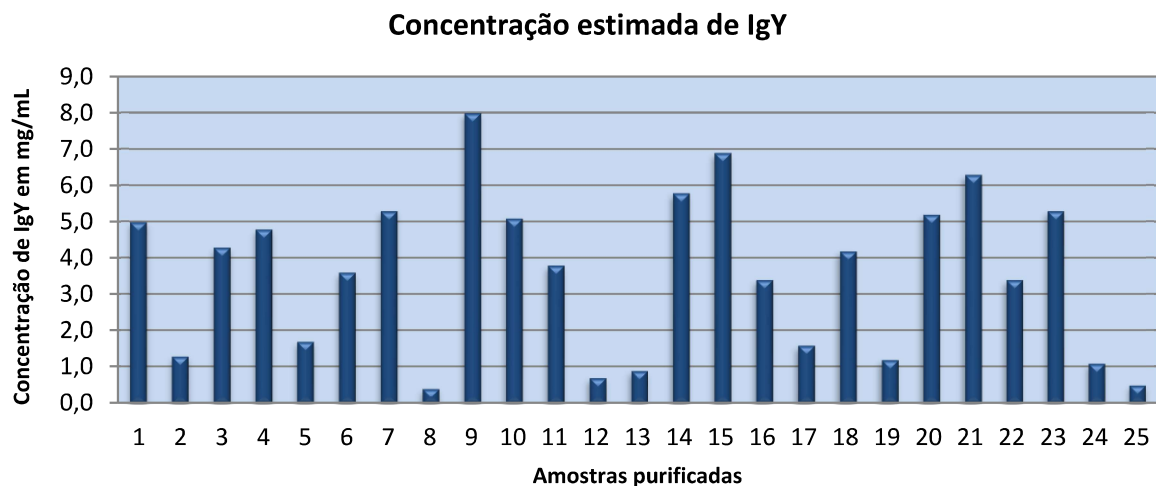


Figura 8. Concentração estimada de IgY utilizando método de espectrofotometria a 280 nm.

A Pauly *et al* (2011) descreve que o processo de purificação por PEG 6000 resulta em concentrações de IgY na faixa de 8,0 mg/mL. De acordo com o gráfico acima, apenas a amostra 9 atingiu o valor descrito. As amostras que apresentaram valores inferiores a 1,0 mg/mL, podem ser desconsideradas, uma vez que esses baixos valores podem ser decorrentes de possíveis erros no processo de purificação.

Como a maioria das amostras apresentaram concentrações variando na faixa de 2,0 e 5,0 mg/mL, significa que o processo de purificação ocorreu de forma satisfatória. Apesar

dessa faixa de concentração ser menor do que o indicado na literatura foi um resultado que apresentou grande reprodutibilidade.

4.1.2 Caracterização por Eletroforese

Através da eletroforese, Figura 9, foi possível observar a presença de duas bandas com tamanhos esperados, que representam a cadeia leve e cadeia pesada da IgY. Esse resultado demonstra que a purificação ocorreu conforme o descrito no protocolo de Pauly et al.(2011), apesar das alterações realizadas.

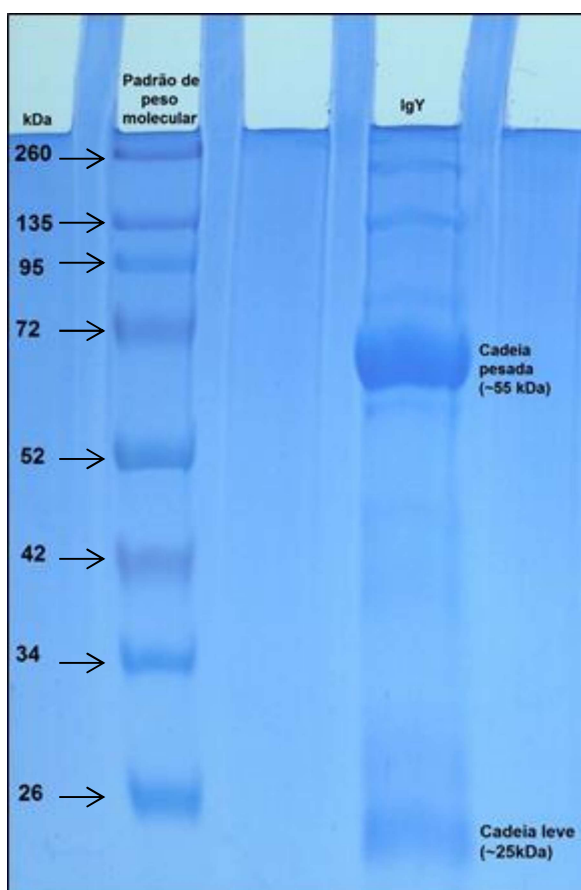


Figura 9. Eletroforese gel dodecil sulfato de sódio - acrilamida (SDS-PAGE) de imunoglobulina IgY anti-NS1 purificados a partir de ovos de galinha, apresentando bandas correspondentes a cadeia pesada, com tamanho aproximado de 55 kDa e cadeia leve com 25 kDa.

4.1.3 Detecção por *Dot Blotting*

A capacidade de reconhecimento da NS1 pela IgY purificada foi confirmada pelo método de *Dot Blotting*, onde a IgY atuava como o anticorpo primário e um anticorpo Anti-IgY conjugado com HRP como anticorpo secundário. A Figura 10, apresenta um controle negativo, que corresponde a purificação de IgY a partir do ovo de uma galinha antes da imunização imunizada, e uma amostras aleatória da purificação do ovo depois da imunização da galinha. O resultado positivo para a capacidade de reconhecimento do anticorpo do teste se dá através do aparecimento de um ponto circular onde a proteína NS1 foi impregnada, e do não aparecimento desse ponto no controle negativo, indicando que não houve ligação inespecífica.

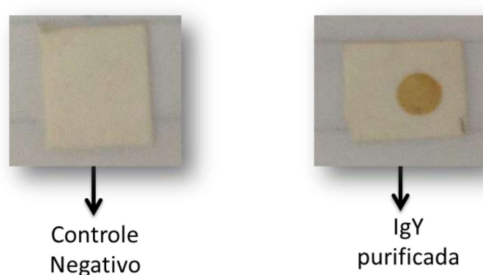


Figura 10. Resultado do *Dot Blotting* de uma amostra purificada IgY e um controle negativo.

4.2 CONJUGAÇÃO COM OURO COLOIDAL

A confirmação do funcionamento da conjugação foi realizado utilizando a membrana de análise do kit comercial da linha BioClin[®] Dengue NS1. Nas figuras 11 e 11 as conjugações foram realizadas no pH 8,0 e na figura 13 a conjugação foi realizada no pH 7,0. Os testes apresentaram resultados satisfatórios devido às fortes marcações. Observando as figuras percebe-se que a melhor condição de conjugação é no pH 8,0, já que apresentou a marcação com a coloração mais acentuada.

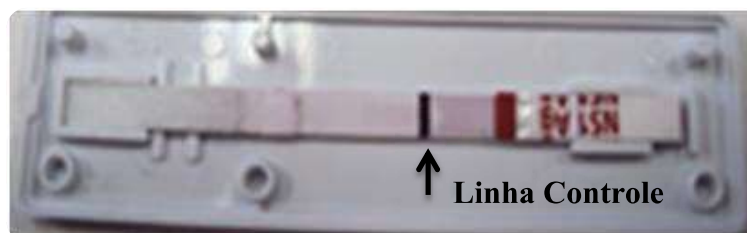


Figura 11. Teste da conjugação no pH 8,0, utilizando o tampão de corrida PBS tween 0,05%.

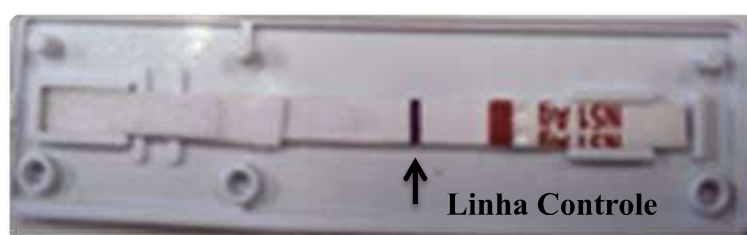


Figura 12. Teste da conjugação no pH 8,0, utilizando o tampão de corrida Tris 100 mM pH 7,4.

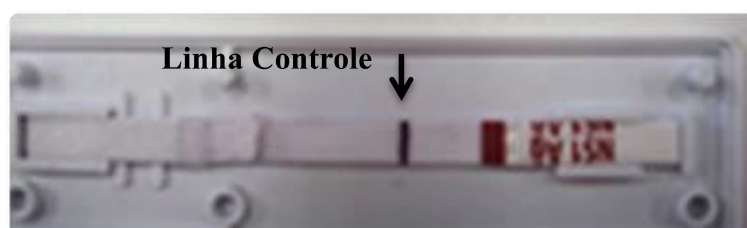


Figura 13. Teste da conjugação no pH 7,0, utilizando o tampão de corrida PBS.

4.3 TESTES IMUNOCROMATÓGRAFICOS

4.3.1 Impregnação e bloqueio das membranas de Análise

A impregnação e bloqueio das membranas foi analisado substituindo-se a membrana do kit comercial da linha BioClin® Dengue pela Millipore Prima 125 impregnada com o antígeno NS1. Para as corridas utilizou-se dois tampões diferentes o Tris 100 mM pH 7,4 e o PBS tween 0,05%.

Os resultados conforme apresentados nas Figuras 14 e 15, exibiram fortes marcações, sendo considerados satisfatórios. Também se observou que não houve diferenças significativas entre os tampões de corrida.



Figura 14. Teste impregnação do antígeno na membrana Millipore Prima 125 bloqueada com uma solução contendo albumina e utilizando tampão de corrida PBS tween 0,05%.



Figura 15. Teste impregnação do antígeno na membrana Millipore Prima 125 bloqueada com uma solução contendo leite e utilizando tampão de corrida Tris 100 mM pH 7,4.

Analisando as Figuras 14 e 15, percebe-se que a impregnação e bloqueio foram eficientes em ambas às condições escolhidas. O bloqueio com a solução contendo a albumina apresentou melhor resultado, uma vez que a linha de controle possui a coloração mais intensa.

4.3.2 Montagem dos testes imunocromatográficos

Montou-se os kits com todos os insumos desenvolvidos no laboratório, variando as membranas Whatman Prima 125, Millipore e Whatman HF 180 impregnadas com o antígeno; e as membranas Fusion 5 e Millipore G041 impregnadas com o IgY conjugado com ouro

coloidal. Testou-se os kits com os tampões de corrida, PBS tween 0,05% e Tris 100 μ M pH 7,5. Os resultados podem ser observados na Figuras 16, 17 e 18.



Figura 16. Teste imunocromatográfico montado com as seguintes membranas: Whatman Wick C083, Whatman Prima 125, Fusion 5 e Whatman Sample 2668. A corrida foi realizada com o tampão PBS tween 0,05%.

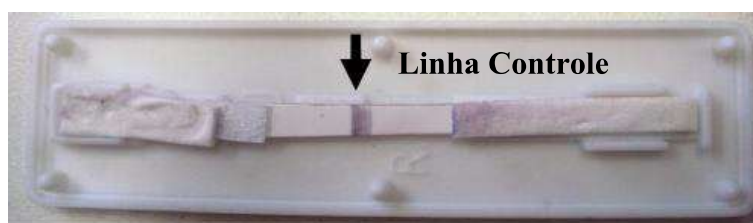


Figura 17. Teste imunocromatográfico montado com as seguintes membranas: Whatman Wick C083, Whatman Prima 125, Fusion 5 e Whatman Sample 2668. A corrida foi realizada com o tampão Tris 100 mM pH 7,4.

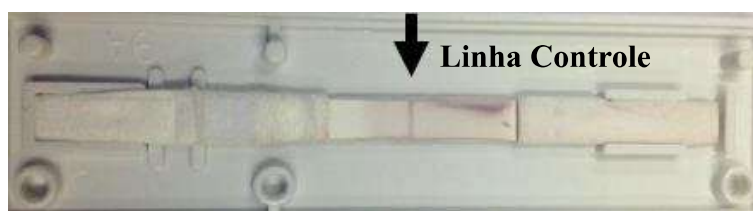


Figura 18. Teste imunocromatográfico montado com as seguintes membranas: Whatman Wick C083, Whatman HF 180, Fusion 5 e Whatman Sample 2668. A corrida foi realizada com o tampão Tris 100 mM pH 7,4.

Todos os kits testados apresentam-se reativos, variando apenas a intensidade da cor da área teste, sendo que as condições do teste da Figura 17 apresentou o melhor resultado, quando comparado com os demais.

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram 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 padronizada e validada pode ser empregada para o desenvolvimento de kit diagnóstico para Dengue que tenha alta sensibilidade e especificidade, empregando-se biotecnologia nacional.

6. BIBLIOGRAFIA

ABBASI, A.; BUTT, N.; SHEIKH, Q. H.; BHUTTO, A.R.; MUNIR, S. M.; AHMED, S. M. **Clinical features, diagnostic techniques and management of dual Dengue and malaria infection.**Journal of the College Physicians and Surgeons Pakistan. v. 19. p.25-29. 2009.

ACOSTA-BAS C. GÓMEZ-CORDERO I. **Biología y métodos diagnósticos del dengue.** Revista Biomedica. v. 16. p. 113-137. 2005.

ALCON, S.; TALARMIN, A.; DEBRUYNE, M.; FALCONAR, A.; DEUBEL, V.; FLAMAND, M. **Enzyme linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections.** Journal of Clinical Microbiology. v. 40. n° 2. p. 376–381. Fevereiro de 2002. 0095-1137/02/\$04.000 DOI: 10.1128/JCM.40.2.376–381.2002.

ALFARESI, M. S.; ELKOUSH, A. A. **Determination of hepatitis C virus genotypes by melting-curve analysis of quantitative polymerase chain reaction products.** Indian Journal of Medical Microbiology. v. 25, n° 3, p. 249–452. 2007.

ALLICE, T.; CERUTTI, F.; PITTALUGA, F.; VARETTO, S.; GABELLA, S.; MARZANO, A.; FRANCHELLO, A.; COLUCCI, G.; GHISSETTI, V. **COBAS AmpliPrep-COBAS TaqMan hepatitis B virus (HBV) test: a novel automated real-time PCR assay for quantification of HBV DNA in plasma.**Journal of Clinical Microbiology. v. 45, n° 3, p. 828–834. 2007. Epub 2007 Jan 17.0095-1137/07/\$08.000.DOI:10.1128/JCM.00914-06

ARAÚJO, A. S. **Produção de antivenonobotrópico em ovos de galinha.** Belo Horizonte: Escola Veterinária da UFMG. 2007.

ARTIMOS, O. S.; RODRIGUES, L. A.; CAMACHO, M. P.; MIAGOSTOVICH, E. S. ARAUJO, AND NOGUEIRA, R. M. **Diagnosis of dengue infection by detecting specific immunoglobulin M antibodies in saliva samples.** J. Virol. Methods, v. 77. p.81–86. 1999.

ANTHONY, R.; SAMBOL, S. H. H. **Evaluation of a new West Nile Virus lateral-flow rapid IgM assay.** Journal of Virological Methods. v. 157. p. 223–226. 2009

BALMASEDA, A.; GUZMAN, M. G.; HAMMOND, S.; ROBLETO, G.; FLORES, C.; TELLEZ, Y. **Diagnosis of Dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) andIgAantibodies in serumand saliva.** Clinic and Diagnostic Laboratory Immunology. v. 10. p. 317–22. 2003.

BALMASEDA, A.; SABORIOA, S.; TELLEZ, Y.; MERCADOA, J.C.; PÉREZA, L.; HAMMOND, S. N.; ROCHAC, C.; KUAND, G.; HARRIS, E. **Evaluation of immunological markers in serum, filter-paper blood spots, and saliva for Dengue diagnosis and epidemiological studies.** Journal of Clinical Virology. v. 43. p. 287–291. 2008.

BLACKSELL, S.D.; MAMMEN, M. P.; THONGPASEUTH, J.S.; GIBBONS, R.V.; JARMAN, R.G. *ET AL.* **Evaluation of the Panbio Dengue virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute Dengue infections in Laos.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. v. 60. p. 43–49. 2008.

BRANCH, S. L.; LEVETT, P. N. **Evaluation of four methods for detection of immunoglobulin M antibodies to Dengue virus.** Clinic and Diagnostic Laboratory Immunology. v. 6. p. 555–557. 1999.

BRÜNING, A.; BELLAMY, K.; TALBOT, D.; ANDERSON, J., **A rapid chromatographic strip test for the pen-side diagnosis of rinderpest virus.** Journal of Virological Methods. v. 81. p. 143–154. 1999.

BURKE, D.S.; MONATH, T. P., **Flaviviruses.** In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., editors. **Fields virology.** Philadelphia. USA: Lippincott Williams & Wilkins. p. 1043–125. 2001.

CAMARA, F. P.; THEOPHILO R. L., *et al.* **Regional and dynamics characteristics of Dengue in Brazil: a retrospective study.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 40. p. 192–196, 2007.

CLARO, L. B.; TOMASSINI, H. C. B.; ROSA, M. L. **Prevenção e controle do dengue: uma revisão de estudo sobre conhecimentos, crenças e práticas da população.** Caderno de Saúde Pública. Rio de Janeiro. v. 20. p. 1447–1457. Novembro de 2004.

CHINNAWIROTPISAN, P.; MAMMEN, M. P.; NISALAK, J. A.; THAISOMBOONSUK, B.; NARUPITI, S.; THIRAWUTH, V.; PUTNAK, R.; ZHANG, C. **Detection of concurrent infection with multiple Dengue virus serotypes in Thai children by ELISA and nested RT-PCR assay.** Archives of Virology. v. 153. p. 2225–2232. 2008.

DUSSART, P.; LABEAU, B.; LAGATHU, G.; LOUIS, P.; NUNES, M. R.; RODRIGUES, S. G. *et al.* **Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of Dengue virus NS1 antigen in human serum.** Clinical and Vaccine Immunology. v. 11. p. 1185–1189. Novembro de 2006.

FERNANDEZ, R.; VASQUEZ, S. **Serological diagnosis of Dengue by an ELISA inhibition method.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 85. p. 347–351. 1990.

FISCHER, M.; HLINAK, A.; MONTAG, T.; CLAROS, M.; SCHADE, R.; EBNER, D. **Comparison of standard methods for the preparation of egg yolk antibodies.** Tierarztl Prax Journal. v. 24. p. 411–418. 1996.

GASSMANN, M.; THÖMMES, P.; WEISER, T.; HÜBSCHER, U. **Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein.** The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. v. 4. p. 2528–2532. 1990.

GIRALDI, C.; NOTO, A.; TENUTA, R.; GRECO, F.; PERUGINI, D.; SPADAFORA, M.; BIANCO, A. M.; SAVINO, O.; NATALE, A. A. **Comparative evaluation between real**

time Roche COBas TAQMAN 48 HCV and bDNA Bayer Versant HCV 3.0. New Microbiologica. v. 29. p. 243–250. 2006.

GOTTSTEIN, B.; HEMMELER, E. **Egg yolk immunoglobulin Y as an alternative antibody in the serology of echinococcosis.** Journal Zeitschrift für Parasitenkunde. v. 71. p. 273–276. 1985.

GUBLER, D.J. ; CLARK, G. C. **Dengue/Dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem.** Emerging Infectious Diseases. v. 01. p. 55–57. 1995.

GUHA-SAPIR, D.; SCHIMMER, B. **Dengue fever: new paradigms for a changing epidemiology.** Emergency Themes in Epidemiology. v. 01. 2005.

GROEN, J.; KORAKA, P.; VELZING, J.; COPRA, C.; OSTERHAUS, A. D. **Evaluation of six immunoassays for detection of Dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. v. 7. p. 867–871. 2000.

HARRIS, E.; VIDEA, E. ; PEREZ, L. ; SANDOVAL, E. ; TELLEZ, Y. ; PEREZ, M. L. *ET AL.* **Clinical, epidemiologic, and virologic features of Dengue in the 1998 epidemic in Nicaragua.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. v. 63. p. 5–11. 2000.

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. **Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG.** Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. v. 57. p. 450–454. 1993.

HSIEH, C.J.; CHEN, M. J. **The commercial Dengue NS1 antigen-capture ELISA may be superior to IgM detection, virus isolation and RT-PCR for rapid laboratory diagnosis of acute Dengue infection based on a single serum sample.** Journal of Clinical Virology. v. 44. *Epub* novembro de 2008.

KINAI, E.; HANABUSA, H.; KATO, S. **Prediction of the efficacy of antiviral therapy for hepatitis C virus infection by an ultrasensitive RT-PCR assay.** Journal of Medical Virology. v. 79. p. 1113–1119. 2007.

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. v. 36. p. 686–692. 2005.

KUMARASAMY, V.; CHUA, S. K.; HASSAN, Z.; WAHAB, A. H.; CHEM, Y. K.; MOHAMAD, M. *ET AL.* **Evaluating the sensitivity of a commercial Dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute Dengue virus infection.** Singapore Medical Journal. v. 48. p. 669–673. Julho de 2007,

KUNO, G.; GOMEZ, I.; GUBLER, D. J. **An ELISA procedure for the diagnosis of Dengue infections.** Journal of Virological Methods. v. 33. p. 101–113. 1991.

KOW, C.Y.; L. L. KONN, *ET AL.* **Detection of Dengue viruses in field caught male *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Singapore by type-specific PCR.** *Journal of Medical Entomology*. v. 38. p. 475–9. 2001.

LAPPHRA, K.; SANGCHARASWICHAI, A.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; TIENGRIM, S.; PIRIYAKARNSAKUL, W. *ET AL.* **Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of acute Dengue infection in patients with acute febrile illness.** Diagnostic Microbiology Infectious Disease. v. 4. p. 387–391. 2008.

LEE, E. N. **Anti-Bacterial Activities of Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) against Enteric Pathogens.** Edmonton. University of Alberta. 2000.

LEONG, A. S.; WONG, K. T.; LEONG, T. Y.; TAN, P. H.; WANNAKRAIROT, P. **The pathology of Dengue hemorrhagic fever.** Seminars in Diagnostic Pathology. v. 24. p. 227–236. 2007.

LEVI, J. E.; TATENO, A. F.; MACHADO, A. F.; RAMALHO, D. C.; DE SOUZA, V. A.; GUILARDE, A. O.; REZENDE, F. V. C.; MARTELLI, C. M.; TURCHI, M. D.; SIQUEIRA, J. B.; PANNUTI, C. S. **Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of Dengue virus in samples collected during an outbreak in Goiania, Central Brazil, in 2005.** Journal of Clinical Microbiology. v. 45. p.1893–1897. 2007.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. **Flaviviridae: the viruses and their replication.** In: Knipe D.M., Howley P. M., editors. Fields virology. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. p. 991–1041. 2001.

MIZUNO Y.; KOTAKI, A.; HARADA, F.; TAJIMA, S.; KURANE, I.; TAKASAKI, T. **Confirmation of Dengue virus infection by detection of Dengue virus type 1 genome in urine and saliva but not in plasma.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene at Science. v. 101. p. 738–739. 2007.

MURATA, T.; SAITO, S.; SHIOZAKI, M.; LU, R.Z.; ETO, Y.; FUNABA, M.; TAKAHASHI, M.; TORII, K. **Anti-activin A antibody (IgY) specifically neutralizes various activinA activities.** Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine. v. 211. p. 100–107. 1996.

NUNES, J. S. **Dengue: Etiologia, patogénese e suas implicações a nível global.** Dissertação de mestrado. Universidade da Beira Interior: Ciências da saúde. Covilhã, Maio de 2011.

PAULY, D. et al. **IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation.** Journal of visualized experiments : JoVE, n. 51, p. 3–7, jan. 2011.

PINHEIRO, F. P.; CORBER, S. J. **Global situation of Dengue and Dengue hemorrhagic fever, and its emergence in the Americas.** World Health Stat Quarterly. v. 50. p. 161–169. 1997.

PINAR, Z.; BUCHANAN, I.; TAM, M.; SMITH, K.; HOOK, E. W. **Preliminary Evaluation of an Immunochromatographic Strip Test for Specific Treponemapallidum Antibodies.** Journal of clinical microbiology. p. 3064–3065. 2002.

REID, S. M.; FERRIS, N. P.; BRÜNING, A.; HUTCHING, G. H.; KOWALSKA, Z.; AKERBLUM, L. **Development of a rapid chromatographic strip test for the pen-side**

detection of foot-and-mouth disease virus antigen. Journal of Virological Methods. v. 96. p. 189–202. 2001.

RUANGTURAKIT, S.; ROJANASUPHOT, S.; SRIJUGGRAVANVONG, A.; DUANGCHANDA, S.; NUANGPLEE, S.; IGARASHI, A. **Storage stability of Dengue IgM and IgG antibodies in whole blood and serum dried on filter paper strips detected by ELISA.** The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine Public Health. v. 25. p. 560–564. 1994.

ROLIM, M. L.M.; **Aspectos clínico-laboratoriais de pacientes com forma grave de dengue em fortaleza – Ceará.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará. 2005.

ROMANOS, M.T.V., SANTOS, N.S.O., ROMANOS, M.T.V., WIGG, M.D. (eds.). **Febre amarela e Dengue. In: Introdução à virologia humana.** Rio de Janeiro, Guanabara koogan. p. 399–409. 2008.

SAMPATH, R.; HALL, T. A.; MASSIRE, C.; LI, F.; BLYN, L. B.; ESHOO, M. W.; HOFSTADLER, S. A.; ECKER, D. J. **Rapid identification of emerging infectious agents using PCR and electrospray ionization mass spectrometry.** Annals of the New York Academy of Sciences. v. 1102. p. 109–120. 2007. Review.

SANDRES-SAUNÉ, K.; ABRAVANEL, F.; NICOT, F.; PERON, J. M.; ALRIC, L.; BOINEAU, J.; PASQUIER, C.; IZOPET, J. **Detection and quantitation of HCV RNA using real-time PCR after automated sample processing.** Journal of Medical Virology. v.79. p. 1821–1826. 2007.

SCHADE, R.; CALZADO, E.G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P.A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H.R. **Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine.** Alternatives to Laboratory Animals. v. 33. p. 129–154. 2005.

SHANGJIN, C.; CHANGMU, C.; GUANGZHI, T. **A simple and rapid immunochromatographic strip test for monitoring antibodies to H5 subtype Avian Influenza Virus.** Journal of Virological Methods. v. 152. p. 102–105. 2008.

SIQUEIRA, J. B.; J. R., MARTELLI, C.M.; et al. **Dengue and Dengue hemorrhagic fever, Brazil, 1981-2002.** Emerging Infectious Diseases journal. v. 11. p. 48–53. 2005.

SILVA, G. F.; SILVA, SANTOS J.; ROCCO, M. I. **Evaluation of commercial kits for detecting the antigen NS1-Dengue.**São Paulo. Bepa v. 91. p. 14–26. 2011.

SULUSHASH, M.; HENK L. S.; KATYA, Z.; THERESIA, H.; ABDOELB, S.; KOZAKOVA, K.S.O.; Philip, H.E.; James, T.D. **The evaluation of a user friendly lateral flow assay for the serodiagnosis of human brucellosis in Kazakhstan.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. v. 65. p. 14–20. 2009.

SHU, P.Y; HUANG, J-H.**Current Advances in Dengue Diagnosis.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. p. 642–650. Julho 2004.

TRAN, T.N.; VRIES, P. J.; HOANG, L. P.; PHAN, G. T.; LE, H. Q.; TRAN, B. Q. *et al.* **Enzyme-linked immunoassay for Dengue virus IgM and IgG antibodies in serum and filter paper blood.** BMC Infectious Diseases. v. 06. p. 13. 2006.

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. **Generation and application of chicken egg-yolk antibodies.** Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular Integrative Physiology. v. 131. p. 569–574. Março 2002.

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.** Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 2010.

VORDAM, V. & KUNO, G. **Laboratory diagnosis of Dengue virus infections.** in DJ Guber and G Kuno (ed). Dengue and Dengue hemorrhagic fever, cab international, London, United Kingdom. p. 313–334. 1997.

YOUNG, P. R.; HILDITCH, P. A.; BLETCHLY, C.; HALLORAN, W. **An antigen capture enzyme linked immunosorbent assay reveals high levels of the Dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients.** Journal of Clinical Microbiology, v. 38, p. 1053–1057, Março 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control.** 2nd ed. Geneva: World Health Organization, 1997.