

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0709565-1 A2**

(22) Data de Depósito: 16/03/2007
(43) Data da Publicação: 12/07/2011
(RPI 2114)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/569 2006.01
C07K 1/22 2006.01
C12N 7/02 2006.01
C07K 1/14 2006.01
C07K 2/00 2006.01

(54) Título: **ENSAIO IMUNOABSORVENTE LIGADO A ENZIMA COMPETITIVA (C-ELISA) PARA DETECÇÃO DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO DE FLAVIVÍRUS**

(30) Prioridade Unionista: 16/03/2006 SG 20061738-8

(73) Titular(es): National Environment Agency

(72) Inventor(es): Bijon Kumarsil, Chenny Shi Cheng Li

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT SG2007000073 de 16/03/2007

(87) Publicação Internacional: WO WO2007/106050 de 20/09/2007

(57) Resumo: ENSAIO IMUNOABSORVENTE LIGADO A ENZIMA COMPETITIVA (C-ELISA) PARA A DETECÇÃO DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO DE FLAVIVÍRUS Um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima competitiva (C-ELISA), usando agentes imunológicos específicos de membro de flavivírus foi desenvolvido para detectar o anticorpo específico aos membros dos flavivírus indicativos de exposição ao flavivírus. O teste é baseado em uma competição para o epítipo de ligação na proteína de envelope do antígeno de flavivírus capturado usando IgA de antinflavivírus na presença de soro positivo de flavivírus. Este teste tem a sensibilidade, especificidade e velocidade comparáveis ao ensaio de neutralização de vírus (VNT). ELISA é uma técnica versátil, que poderia ter várias aplicações. Ligeiras modificações deste protocolo poderiam conduzir a um método de detecção baseado em ELISA de infecção secundária ou um que poderia ser usado para estudos soro-epidemiológicos específicos de sorotipo e/ou avaliação de vacinas. O protocolo desenvolvido para C-ELISA foi demonstrado usando o antígeno de usado de dengue e o anticorpo monoclonal específico de dengue. Isto pode ser usado contra outros flavivírus e os resultados para a encefalite japonesa ilustram isto.

ENSAIO IMUNOABSORVENTE LIGADO A ENZIMA COMPETITIVA (C-
ELISA) PARA A DETECÇÃO DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO DE
FLAVIVÍRUS

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se especificamente a uma
técnica de detecção de exposição de um ser humano e/ou de
um animal a um flavivírus ou a um equivalente do mesmo.
Mais particularmente, a presente invenção refere-se a uma
análise rápida e fácil de uma amostra biológica colhida de
10 um indivíduo (animal ou ser humano) a fim de determinar se
o indivíduo foi exposto previamente a um membro da família
do flavivírus ou equivalente do mesmo. A presente invenção
ainda fornece a sorotipagem da exposição de flavivírus
baseado na análise de soro e fornece kits de diagnósticos
15 médicos e a soro-avaliação diferencial aos membros de uma
infecção de flavivírus ou de um equivalente do mesmo. A
invenção é particularmente importante para a detecção de
infecção secundária de flavivírus, definindo a sorotipagem
de infecção precedente, soro-epidemiologia e avaliação de
20 vacina.

FUNDAMENTO

A família de Flaviviridae contém uma miríade de vírus
que causam doenças nos seres humanos e são geralmente
transmitidos por mosquitos e carrapatos. O gênero
25 Flavivírus contém um número de vírus que incluem o vírus da
febre amarela (YF), o vírus de febre da dengue Oeste-Nilo
(WN) e o vírus da encefalite japonês (JE) que são
responsáveis para suas doenças correspondentes.

A dengue é a infecção de flavivírus artrópode-
30 veiculada difundida e mais comum no mundo e mais de 1,2

milhões de infecções de dengue ocorrem anualmente enquanto 2,5 bilhões de pessoas estão em risco vivendo na área endêmica de dengue do mundo (WHO/TDR, abril 2005). Há quatro sorotipos de vírus distintos, cada um capaz de
5 produzir um amplo espectro de sinais e sintomas e uma infecção primária com um dos quatro sorotipos conferem imunidade durável a esse tipo. A possibilidade de infecção secundária com sorotipos diferentes ainda permanece.

Embora a dengue seja endêmica na maioria dos países
10 tropicais e subtropicais, ocorre principalmente nos países em desenvolvimento que falta a infra-estrutura de cuidados médicos ou as capacidades financeiras para diagnosticar prontamente e eficazmente a dengue. Em Singapura, uma distribuição desigual dos dois vetores resultou na
15 transmissão desigual de dengue dentro de população (Ooi e outros, 2001). Fazendo-se uma inspeção sorológica, determinou-se que uma mudança na localização onde a dengue foi adquirida poderia ter ocorrido. Essa descoberta pode ajudar na modificação de programas de controle de vetor
20 para direcionar novas áreas de transmissão. Entretanto, somente quatro inspeções soro-epidemiológicas foram completadas até agora. O custo elevado de testes laboratoriais ou a falta de reagentes necessários contribui para que poucas inspeções sejam conduzidas.

25 Tradicionalmente, a inibição de hemoaglutinação (HAI) foi usada para detectar anticorpos contra a dengue. Entretanto este método exige antígenos derivados de cérebro camundongo que não estão prontamente disponíveis devido às dificuldades no crescimento de tais células. Outro método
30 usado comumente é fixação de complemento, mas isto exige

anticorpos que tem vida curta. Cada vez mais os laboratórios estão recorrendo aos kits comerciais de ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA). Entretanto, nenhum destes testes são específicos para os anticorpos de
5 dengue e tem reação cruzada com outros membros de Flavivírus co-circulantes na mesma região, como a Encefalite Japonesa (JE), Oeste do Nilo, Hepatite C, Febre Amarela, Encefalite Murray Valley, etc.

As sensibilidades do desempenho de seis sistemas de
10 imunoensaio disponíveis comercialmente para a detecção de imunoglobulina M específica de vírus da dengue (IgM) e anticorpos IgG em soro (Goren e outros 2000) têm sido avaliadas recentemente. As sensibilidades dos ensaios vírus-específicos de dengue avaliados variaram entre 71 e
15 100% para IgM e entre 52 e 100% para IgG, com especificação de 86 a 96% e 81 a 100% respectivamente. O tempo de teste total destes testes variou de 7 a 480 minutos. Além disso, todos os testes exigem o suporte de equipamento de laboratório exceto Pan-bio RIT e sua sensibilidade e
20 especificidade para o ensaio de IgG de dengue foram muito baixas (75% e 52% respectivamente). Entretanto, nenhum dos testes avaliados nestes estudos puderam detectar o anticorpo específico de dengue, mas tiveram reação cruzada com outros Flavivírus. Conseqüentemente, a detecção de uma
25 infecção secundária precoce é um pouco difícil presentemente, pois somente a presença IgG específica de dengue durante uma fase aguda (febril) de infecção indica a infecção secundária de dengue (Schilling e outros, 2004).

Os estudos soro-epidemiológicos mostraram que a
30 infecção secundária é um fator de risco principal para a

febre de dengue hemorrágica e a síndrome de choque de dengue através do aumento de síndrome dependente de anticorpos (ADE) (Halstead e outros, 1973, Halstead S.B., 1988). Para investigações epidemiológicas e patológicas, é importante diferenciar entre a infecção de vírus primária e secundária e determinar sorotipos de dengue de infecções passadas e presentes.

A técnica de diagnóstico de dengue utilizada mais amplamente é a análise sorológica das amostras suspeitadas. Entretanto a técnica é um pouco complicada por causa de diversas razões - (i) os pacientes podem ter infecções múltiplas e seqüenciais com os quatro sorotipos de vírus da dengue devido a uma falta de anticorpos de neutralização protetores de reações cruzadas; (ii) infecções de flavivírus seqüenciais e múltiplas fazem o diagnóstico diferencial difícil devido à presença de anticorpos pré-existent e sin antigênico original (muitos clones de Célula B que respondem à primeira infecção de flavivírus são re- estimulados para sintetizar o anticorpo precoce com uma afinidade maior para o primeiro vírus de infecção do que para o vírus de infecção atual em cada infecção subsequente de flavivírus) nas regiões onde dois ou mais Flavivírus estão co-circulando; (iii) Os anticorpos IgG têm altos níveis de reatividade cruzada aos antígenos de flavivírus homólogos e heterólogos; e (iv) o sorodiagnóstico de infecções de vírus da dengue passadas, recentes, e presentes é difícil devido à persistência longa de anticorpos IgG ($\geq$ 10 meses, como medidos pela ELISA de IgG de captação de E/M específica, ou longa vida, como medido pelo ELISA de IgG de antígeno de revestimento de

indireto de E/M) em muitos pacientes de dengue com infecções secundárias (Gubler, D.J. 1996 e Innis e outros 1989).

Assim, entre as infecções virais que podem ser diagnosticadas por sorologia, a infecção de vírus da dengue está entre o mais desafiante. Entretanto, os grandes avanços em analisar os antígenos virais complexos e as respostas de anticorpo foram feitos recentemente pelo desenvolvimento de vários métodos que procuram as proteínas estruturais e não estruturais (NS) diferentes para estudos sorod diagnósticos e soroepidemiológicos de infecção de vírus da dengue.

O teste de inibição de hemoaglutinação (HAI) tem sido usado tradicionalmente para a diferenciação de infecção de dengue primária e secundária. É agora menos popular devido às desvantagens inerentes do teste (Innis e outros, 1989 e Shu e outros, 2003). Em contraste, a captação de ELISAs de IgM e IgG tornaram-se os ensaios mais poderosos para a diferenciação de infecção primária e secundária devido à sensibilidade e especificidade elevadas (Innis e outros, 1989, 1997). Entretanto, para a sorotipagem de infecção de dengue particularmente para a investigação soroepidemiológica, nem a captação de ELISA de IgM nem ELISA de IgG é útil devido à anticorpos de neutralização cruzada entre anticorpos de sorotipos de dengue.

O teste de neutralização de vírus (VNT) é a técnica padrão de ouro atualmente disponível que pode ser usada para distinguir entre a dengue e os outros Flavivírus (manual WHO 2002). O VNT é também usado para discriminar entre sorotipos de dengue (sorotipos 1 a 4). Os anticorpos

de soro criados contra um ou outro vírus podem neutralizar todos os sorotipos de dengue e mesmo outros Flavivírus igualmente, mas neutralizariam o vírus homólogos em um título mais elevado que neutralizariam os vírus heterólogos (Makino e outros, 1994). Infelizmente, anticorpos antidengue (IgM) se desenvolveram em uma fase precoce da infecção aumentando a um nível igual de neutralização contra todos os sorotipos de dengue; conseqüentemente a infecção secundária não pode ser determinada nesta fase por VNT (Nawa e outros, 2000). Por outro lado, VNT tem as seguintes desvantagens:

- i. Necessita de laboratório de cultura de célula sofisticado e pessoal treinado;
 - ii. Duração de teste é mais do que uma semana;
 - 15 iii. O soro de um paciente com uma infecção de dengue com menos de seis meses não pode ser sorotipado devido aos anticorpos de reação cruzada de dengue;
 - iv. Dificuldade de detectar sorotipos de dengue múltiplos;
 - 20 v. 10% de soro tem efeito tóxico na cultura de célula;
- Innis e outros (1989), a primeira classificação proposta de infecções primária e secundária pela determinação da razão das unidades de anticorpos IgM de vírus da dengue pelas unidades de anticorpos IgG de vírus da dengue. Elas mostraram que os soros de fase aguda de
- 25 pacientes com infecções primárias de vírus da dengue tiveram razões de IgM/IgG mais elevadas, visto que os pacientes com infecções secundárias tiveram razões de IgM/IgG mais baixas. Este método fez uma grande
- 30 contribuição para a análise do status imune de pacientes

com dengue. Muito recentemente, Shu e outros, 2003, modificaram e simplificaram o método acima para diferenciar a infecção primária e secundária de vírus da dengue usando a razão de leituras de IgM/IgG diretamente ($> 1,2$ indica a
5 infecção primária ou < 1.2 indica a infecção secundária, respectivamente) sem calcular as unidades de anticorpo através do uso de um controle padrão.

Recentemente, Ludoffs e outros, 2002 relataram a diferenciação sorológica de infecções com sorotipos de
10 dengue 1 a 4 usando antígenos recombinantes. Tiras de Immunoblot pontilhadas com os domínios de B de sorotipos de vírus da dengue 1 a 4 expressados em *Escherichia coli* usado para detectar anticorpos específicos de sorotipo da dengue em amostras emparelhadas de soro de 41 pacientes com
15 infecções primária e secundária. Embora alguma reatividade cruzada com sorotipos heterólogos foi observada, os resultados mostraram a 93,94% de especificidade, porém a sorotipagem não é confiável para a infecção secundária através deste método.

20 Os problemas enfrentados para o vírus da dengue são encontrados igualmente por outros Flavivírus, com características antigênicas compartilhadas, conseqüentemente dificulta no diagnóstico exato. Há uma necessidade, portanto, para um teste rápido, confiável, e
25 simples que possa distinguir o anticorpo específico de flavivírus em qualquer estágio de infecção a partir do anticorpo para outros Flavivírus, assim como entre sorotipos de flavivírus. Os procedimentos de detecção sorológica têm o papel potencial de agir no diagnóstico
30 clínico para diferenciar infecções de flavivírus de outras

doenças infecciosas similares ao flavivírus assim como em estudos de soro-vigilância e na avaliação de vacinas. Tais técnicas ajudarão na detecção precoce de infecção secundária conduzindo para melhor gerenciamento de caso, a

5 fatalidade de caso reduzida e o custo de tratamento.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para detecção de exposição de um indivíduo a um flavivírus ou equivalente do mesmo, o

10 referido método compreendendo:

contatar uma amostra biológica do indivíduo com uma mistura de componentes capturados de IgA de antinflavivírus flavivírus ou um equivalente;

submeter a amostra biológica e os componentes

15 capturados de IgA de antinflavivírus a um agente competidor imunológico específico de flavivírus;

determinar a presença de um complexo que forma entre um parceiro de ligação específico de flavivírus presente na amostra biológica e um Componente capturado de IgA de

20 antinflavivírus na presença de agente competidor imunológico específico de flavivírus.

A presente invenção resulta de uma necessidade de desenvolver um ensaio de baixo custo, rápido, e direto para determinar a exposição específica prévia ou presente a um

25 flavivírus. A invenção utiliza especificamente um agente competidor imunológico específico de flavivírus para competir com um parceiro de ligação a partir do corpo hospedeiro para o epitopo específico ao flavivírus ou a sua presença de sorotipos na proteína de envelope de

30 flavivírus, que inclui uma mistura de componentes

capturados de IgA de antinflavivírus incluindo partículas de flavivírus dentre outros antígenos indicativos de infecção de flavivírus.

Conseqüentemente, a presente invenção mostra maior
5 especificidade e sensibilidade comparada a outro ELISA de captura ou indireto de IgG de flavivírus mais usado atualmente e convencional pelo fornecimento de uma plataforma que pode especificamente identificar o anticorpo (IgG) produzido contra o flavivírus ou relacionados
10 imunológicos do mesmo em qualquer estágio da infecção.

Preferivelmente, o flavivírus é selecionado de um grupo que inclui o vírus da febre amarela, o vírus da febre da dengue, o vírus JE, o vírus do Oeste do Nilo, o vírus da Hepatite C, o vírus de Murray Valley e a encefalite de St.
15 Louis.

Em um outro aspecto de invenção é fornecido um kit de detecção de exposição de um indivíduo a um flavivírus ou equivalente do mesmo, o referido kit compreendendo:

componentes capturados de IgA de antinflavivírus a
20 partir de flavivírus;

agente competidor imunológico específico de flavivírus; e

pelo menos um agente de detecção para detectar um complexo que forma entre um parceiro de ligação presente em
25 uma amostra biológica e um componente capturado de IgA de antinflavivírus na presença do agente competidor imunológico específico de flavivírus.

A presente invenção também fornece componentes individuais do kit para o uso no método da presente
30 invenção que inclui suportes sólidos tais como placas de

microtítulo e membranas de nitrocelulose em que os componentes capturados de IgA de antinflavivírus são imobilizados.

A presente invenção também fornece um método para
5 avaliar o risco relativo de um ou mais indivíduos sendo expostos ao flavivírus ou ao equivalente do mesmo dentro de uma localização definida (por exemplo, área geográfica, moradia, meios de transporte ou centro para o tratamento médico ou avaliação), compreendendo:

10 a) obtenção de amostras de uma população representativa dentro de uma localização definida; e

b) avaliando a evidência de exposição de membros individuais de uma população de amostra a um flavivírus ou
15 equivalente do mesmo pelo método que compreende as etapas de:

i) contatar uma amostra biológica a partir do indivíduo com um componente derivado do flavivírus ou
equivalente do mesmo para formar um complexo entre os
componentes e um parceiro de ligação indivíduo-derivado do
20 componente contido dentro da amostra biológica;

ii) determinar a presença do complexo, onde a presença do complexo é indicativa de exposição do indivíduo a um flavivírus ou equivalente do mesmo; e

c) avaliar o risco relativo de exposição dentro da
25 localização definida.

A análise de risco pode ser conduzida usando o software em um formulário lido por computador. Conseqüentemente, a presente invenção ainda relaciona-se a um programa lido por computador e computador apropriado
30 para analisar a exposição de indivíduos ou grupo de

indivíduos ou um risco de exposição de indivíduo ou grupo de indivíduos a um flavivírus ou equivalente do mesmo.

FIGURAS

A Figura 1 mostra a otimização de antígeno de lisado de dengue na placa de poliestireno capturada de IgA de antídengue. A Figura 1 (A) mostra uma comparação de MAb-capturado e ELISA capturado de IgA de antídengue. (a) Detecção de vírus da dengue (sorotipo-2) usando o antígeno de vírus de sobrenadante de célula. O vírus foi diluído em diluição de 10 vezes (Log_{10}) iniciando de 10^6 pfu/ml a 10^2 pfu/ml em diluente de vírus, (b) Detecção de vírus da dengue (sorotipo-2) usando antígeno de lisado de célula. Em ambos os casos o ELISA capturado de IgA de antídengue mostrou melhor desempenho que o ELISA MAb-capturado.

A Figura 2 mostra a otimização de anticorpos monoclonais contra cada sorotipo de antígenos de lisado de dengue. A determinação da diluição ótima de MABs. (a). Diluições duplas de série de cada MAB (1:250 a 1:32000) foram reagidas com a diluição de dupla de soro positivo de dengue e dois negativos de dengue (um foi negativo à ELISA de IgG indireto de dengue e o outro foi positivo a ELISA de IgG e febre amarela VNT mas negativo à dengue VNT) em um C-ELISA. Uma diluição de MAB de 1:2000 foi escolhida.

A Figura 3 mostra a otimização soros positivos e negativos de IgG de dengue usando ELISA competitivo (C-ELISA). Determinação de uma diluição ótima de soro para C-ELISA. A diluições duplas em série de soros de controle positivos e reação cruzada de flavi e negativos foram reagidos com a diluição de MAB pan-den ótima (1:2000) em um C-ELISA. Para minimizar o volume de soro exigido, uma

diluição de soro de 1:20 foi escolhida como a diluição preferida que foi realizada somente um pouco melhor.

A Figura 4 mostra a determinação do ponto de corte de C-ELISA usando soros negativos e positivos de dengue confirmados de VNT. O estabelecimento de um ponto de corte negativo para o C-ELISA. (a) Todos os soros negativos de IgG de dengue ($n = 100$); (b) Soros positivos de IgG de dengue detectados por VNT ($n = 64$). (b) A linha pontilhada representa o ponto de corte de 30% de inibição (média mais 3 desvio padrão) para distinguir entre amostras negativas e positivas.

A Figura 5 mostra a avaliação comparativa de três técnicas de detecção de IgG específicas de dengue, ELISA de bloqueio, ELISA competitivo pré-incubado e simultâneo. A comparação de B-ELISA com C-ELISA (adição simultânea e pré-incubação de MAb). Cada ponto de dado é a média de quatro valores; soros positivos (Log_2 100 TCID₅₀, 8) e negativos moderados. A adição simultânea de soro de teste e anticorpo monoclonal mostrou baixo nível de desempenho (1:40 positivo) comparado a pré-incubação e ELISAs de bloqueio (1:160).

A Figura 6 mostra os resultados de C-ELISA usando 10 amostras de soro triplas (coletadas no dia-1, no dia-4 e no dia-20) dos casos de dengue confirmados. A presença de IgG específico de dengue foi detectada das amostras triplas de dengue confirmadas em 10 pacientes (por PCR) no dia 1, no dia 4 e no dia 20. Os níveis de IgG específico antidengue nas segunda e terceira coletas foi aumentado substancialmente comparado à primeira coleta.

A Figura 7 mostra resultados de coeficiente de

correlação entre C-ELISA e VNT. A regressão linear de amostras de soro específicas de IgG antidengue mostra um nível elevado de correlação entre C-ELISA e VNT ($r=0.91$) e indica um nível elevado de especificidade comparado a
5 técnica "padrão de ouro".

A Figura 8 mostra o coeficiente de correlação entre 30 e 15 minutos de uma etapa de C-ELISA. A regressão linear de dois ensaios mostra o nível elevado de correlação ($r=0,9675$).

10 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Em um primeiro aspecto da presente invenção, é fornecido um método para a detecção de exposição de um indivíduo a um flavivírus ou equivalente do mesmo, o método referido compreendendo:

15 contatar uma amostra biológica do indivíduo com uma mistura de componentes virais de flavivírus capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus ou de um equivalente;

 submeter a amostra biológica e os componentes capturados de IgA de antinflavivírus a um agente competitivo
20 imunológico específico de flavivírus;

 determinar a presença de um complexo que forma entre um parceiro de ligação específico de flavivírus presente na amostra biológica e um componente capturado de IgA de antinflavivírus do flavivírus na presença do agente
25 competitivo imunológico específico de flavivírus.

A presente invenção resulta de uma necessidade para desenvolver um ensaio rápido, específico, de baixo custo e direto para determinar a exposição presente ou prévia a um flavivírus. O método usa IgA de antinflavivírus para
30 capturar antígeno de flavivírus preferivelmente de lisado

bruto de célula. O lisado deriva-se de células infectadas com flavivírus compreendendo uma mistura de componentes de flavivírus, preferivelmente componentes imunogênicos. Os indivíduos incluindo animais, tais como mamíferos e em particular seres humanos são verificados para a presença de parceiros de ligação específicos de flavivírus em uma amostra biológica na presença de um agente competitivo imunológico específico de flavivírus. Os parceiros de ligação preferidos são parceiros de ligação derivados de indivíduo tal como, mas não limitado às moléculas imunointerativas. Preferivelmente, as moléculas imunointerativas são os anticorpos particularmente a imunoglobulina G (IgG) ou fragmentos de imunointerativos. Adicionalmente, a especificidade é melhorada com o uso de um agente imunológico específico de flavivírus como um competidor do parceiro de ligação específico de flavivírus na amostra biológica. A identificação de tais parceiros de ligação ou agentes competitivos imunológicos específicos de flavivírus é usada então como uma evidência de exposição presente ou prévia do indivíduo ao flavivírus ou um equivalente do mesmo por sua habilidade de formar um complexo com o componente capturado de IgA antinflavivírus. Conseqüentemente a invenção utiliza uma combinação de componentes capturados de IgA de antinflavivírus e de C-ELISA.

Conseqüentemente, a presente invenção mostra maior sensibilidade e especificidade comparada ao ELISA de IgG de flavivírus mais usado atualmente e convencional pelo fornecimento de uma plataforma que pode identificar anticorpos produzidos contra o flavivírus ou os

relacionados imunológicos do mesmo em qualquer estágio da infecção.

Durante toda a descrição e reivindicações desta especificação, o uso da palavra "compreende" e variações da
5 palavra, tais como "compreendendo" e "é compreendido", não é pretendido excluir outros aditivos, componentes, inteiros ou etapas.

Flavivírus

O termo "flavivírus" ou "Flavivírus" como usado aqui
10 nas reivindicações e descrição inclui a família Flaviviridae dos Flavivírus incluindo o gênero flavivírus que causa doenças nos seres humanos e é geralmente transmitido por artrópodes tais como mosquitos e carrapatos. Os vírus são responsáveis por doenças tais
15 como, mas não limitado a, febre amarela, febre de dengue e JE. A espécie de Flavivírus que compõe o gênero demonstrou alguma conservação de seqüências no nível de seqüência de nucleotídeo e aminoácido. Os vírus incluídos no gênero dos Flavivírus incluem mas não são limitados ao vírus da febre
20 amarela, vírus da dengue Oeste do Nilo e vírus JE. Devido às similaridades no nível de nucleotídeo e aminoácido, estes vírus podem mostrar similaridades em antigenicidade, transmissão e doença.

Vírus da dengue

25 O termo "vírus da dengue" como usado aqui nas reivindicações e descrição refere-se a todos os sorotipos de dengue (Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4) associados com uma infecção de dengue. A presente invenção é aplicável para detecção da infecção ou exposição de vírus da dengue em
30 quaisquer indivíduos incluindo animais humanos e não

humanos e animais de laboratório. Os indivíduos humanos, entretanto, são preferidos de acordo com a presente invenção. Entretanto, a invenção inclui qualquer indivíduo que pode responder a uma infecção ou imunização pelo vírus da dengue ou um equivalente do mesmo.

Um vírus da dengue é definido como um grupo de vírus humano de RNA consistindo de partículas envelopadas de aproximadamente 40 a 50nm de diâmetro. O genoma viral é aproximadamente 11kb (Stollar e outros, 1966). O virion maduro consiste em um genoma de RNA de sentido positivo fechado por um núcleocapsídeo isométrico. O genoma codifica um único quadro de leitura aberto de aproximadamente 11000 nucleotídeos, codificando para as três estruturas (C-Capsídeo, M-Membrana e E-Envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a e NS2b, NS3, NS4a e NS4b, NS5).

O vírus da dengue é transmitido aos seres humanos através de mordidas de mosquitos *Aedes* fêmeas infectados, principalmente o mosquito *A. aegypti*. Este é um mosquito tropical pequeno, preto e branco, altamente domesticado que prefere colocar seus ovos em recipientes artificiais encontrados em torno de casas que podem conter água, tal como baldes, vasos de flor e outros recipientes de água. Os mosquitos adultos são raramente notados do lado de fora; geralmente descansam em locais internos escuros, são discretos e preferem se alimentar de seres humanos ou animais durante as horas claras do dia, com a maioria da atividade de mordida ocorrendo ao amanhecer ou no fim da tarde (Gubler e outros, 1992; Newton e outros, 1992). Os mosquitos fêmeas são alimentadores nervosos, interrompendo o processo de alimentação no movimento mais leve do

hospedeiro, assim retornando ao mesmo ou a um hospedeiro diferente para continuar a se alimentar. Por causa deste comportamento o mosquito frequentemente se alimenta de diversas pessoas durante uma única refeição de sangue e se infectado pode transmitir o vírus à múltiplas pessoas (Platt e outros, 1997; Scott e outros, 1997). Tal comportamento foi usado para explicar a observação epidemiológica que as doenças de dengue ocorrem principalmente em crianças embora em determinados lugares, como Singapura, isto pode ter mudado devido à adaptação às medidas de controle de vetor (Ooi e outros, 2001).

Seguindo a mordida de um mosquito fêmea infectado, o vírus submete-se a um período de incubação intrínseco de 3 a 14 dias (média de 4 a 7 dias) após o qual a pessoa pode experimentar o início agudo de febre acompanhada por outros sinais e sintomas não específicos. Durante este período virêmico (que pode estar entre 2 a 7 dias) o vírus circula no sangue de seres humanos infectados. Se um mosquito *Aedes* não infectado se alimenta no hospedeiro durante este período virêmico, este mosquito se tornará contaminado após um período de incubação extrínseco obrigatório de 10 a 12 dias, ele poderia subsequenteiramente transmitir o vírus a outros hospedeiros não infectados. Neste ciclo de transmissão, os seres humanos são os hospedeiros de amplificação principais para o vírus embora estudos mostrem que os macacos podem ficar infectados e talvez servir como uma fonte para o vírus (Putnam e outros, 1995; Gubler e outros, 1976; WHO, Fact sheets, 2002).

A infecção de vírus da dengue causa um espectro de doença nos seres humanos dependendo do vírus de infecção,

condições de idade do hospedeiro e imunológicas. Pode resultar em doença assintomática ou variar de uma doença não diferenciada de gripe (síndrome viral) à febre de dengue (DF), à febre hemorrágica de dengue (DHF), e
5 síndrome de choque de dengue severa e fatal (DSS) (Nimmannitya, 1993: WHO, 1997).

A Organização Mundial de Saúde estabeleceu padrões para a classificação da severidade de DHF. Há quatro classes de severidade das quais a classe III e a classe IV
10 são consideradas como sendo a síndrome de choque de dengue (DSS).

Classe I: Febre com sintomas constitucionais não específicos, e a única manifestação hemorrágica é um teste de torniquete positivo e ou ferimento fácil.

15 Classe II: Adicionalmente a manifestação da classe I, sangramento espontâneo na forma da pele ou outras hemorragias.

Classe III: Falha circulatória manifestada por um pulso fraco rápido, redução da pressão de pulso ou
20 hipotensão com a presença de pele fria, viscosa e não descansada.

Classe IV: Choque profundo com pressão sanguínea ou pulso indetectável (WHO, 1997).

A febre de dengue clássica é mais comum em crianças
25 mais velhas, adolescentes e adultos, e são menos prováveis de serem assintomáticos (Sharp e outros, 1995). A febre é abrupta em seu início com febre alta, dor de cabeça, mialgias e artralgias incapacitantes, vômito de náusea e prurido macular ou maculopapular (Waterman, 1989). A febre
30 geralmente dura por 5 a 7 dias e às vezes pode seguir um

curso bifásico (aparência de "Saddleback") (Nimmannitya, 1993).

A DHF é primeiramente uma doença das crianças mais novas abaixo de 15 anos, embora também possa ocorrer nos
5 adultos e é principalmente associada com as infecções secundárias de dengue (Sumarmo e outros, 1983; WHO). O estágio crítico de DHF é no momento da diminuição da febre, quando a temperatura se torna normal. Os fatores principais que determinam a severidade da doença no momento são
10 extravasamento de plasma devido à permeabilidade vascular aumentada e a homeostase anormal e outras manifestações hemorrágicas comuns como petéquias, lesões purpúricas, e equimoses. Estes sintomas, mais um teste positivo de torniquete são úteis para o diagnóstico exato de DHF
15 (Gubler DJ., 1998).

O DSS é o estágio terminal de DHF e é manifestado por choque hipovolêmico devido ao extravasamento de plasma (WHO, 1997). Há quatro sinais de aviso de DSS: dor abdominal sustentada, vômito persistente, inquietação ou
20 letargia, e uma mudança repentina de febre à hipotermia com transpiração e prostração. O reconhecimento precoce e o tratamento apropriado por equipe hospitalar experiente podem diminuir a taxa de fatalidade de caso de DSS a 0,2%, mas uma vez que o choque acontece a taxa de mortalidade
25 pode ser de mais de 40% (Nimmannitya, 1994; Rigau-Perez JG, e outros, 1998).

A proteína E, a maior e a única proteína estrutural exposta na superfície do vírus, é a proteína principal envolvida em reações imunológicas tais como ligação com
30 receptor, hemoaglutinação e neutralização. A infecção nos

seres humanos por um dos sorotipos fornece a imunidade prolongada a esse sorotipo, mas somente proteção temporária contra outros sorotipos.

O núcleoplasmídeo por sua vez é cercado pelo lipídeo contendo as proteínas de envelope e de membrana. Além das proteínas de envelope e capsídeo, o vírus da dengue tem sete proteínas não estruturais NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5.

Vírus de encefalite japonesa

A encefalite japonesa é uma doença que é espalhada aos seres humanos por mosquitos infectados. É uma de um grupo de doenças de vírus transmitidas por mosquito que podem afetar o sistema nervoso central e causar complicações severas e mesmo a morte.

A encefalite japonesa é causada pelo vírus de encefalite japonesa, um arbovírus. Os arbovírus são um grupo grande de vírus que são espalhados por determinados animais invertebrados (artrópodes), mais geralmente por insetos chupadores de sangue. Como a maioria de arbovírus, a encefalite japonesa é espalhada por mosquitos infectados (*Culex spp*).

Aqueles infectados desenvolvem sintomas suaves ou nenhum sintoma. Naqueles que desenvolvem uma doença mais severa, a encefalite japonesa começa geralmente como uma gripe, com febre, calafrios, cansaço, dor de cabeça, náusea, e vômito. A confusão e a agitação também podem ocorrer na fase inicial. A doença pode progredir a uma infecção séria do cérebro (encefalite) e pode ser fatal em 30% dos casos. Entre os sobreviventes, outros 30% dos pacientes mostraram seqüelas neurológicas permanentes.

Há outros flavivírus, que causam a encefalite viral e estão dentro do escopo da presente invenção. Eles têm um quadro de doença similar, e incluem:

- Encefalite de St Louis e Murray Valley
- 5 • Encefalite de Verão Primavera Russo, transmitida por carrapatos.

Outros três vírus de encefalite pertencem ao gênero de Alfavírus e são transmitidos também pela mordida de mosquito. São a encefalite eqüina Ocidental, Oriental e
10 Venezuelana, ou WEE, EEE e VEE respectivamente. Elas ocorrem na América do Norte e do Sul. Há também vacinas que protegem contra EEE e WEE.

Como a encefalite japonesa estes vírus frequentemente produzem somente os sintomas gerais suaves, similares à
15 gripe suave.

O diagnóstico desta doença tem sido feito previamente detectando anticorpos no soro e no CSF (líquido cerebroespinal) pela ELISA de captura de IgM, mas isto mostrou menos especificidade e o processo pode levar um
20 longo tempo. Uma vacina está disponível, mas os antivirais são geralmente ineficazes a menos que administrados dentro de horas da infecção, conseqüentemente o tratamento é principalmente de suporte. O vírus de encefalite japonesa não é transmitido entre seres humanos. A infecção com JEV
25 conferencia imunidade prolongada.

Equivalentes

O termo "equivalente" como usado aqui e aplicado ao flavivírus é pretendido de incluir as moléculas similares que podem provocar o mesmo ou a resposta similar que o
30 flavivírus ou uma proteína estrutural ou não estrutural de

flavivírus poderiam provocar. Por exemplo, os vários antígenos expressos pelo flavivírus em vários estágios de infecção ou várias partículas ou fragmentos de vírus podem causar os efeitos similares que o vírus inteiro causa. A
5 resposta pode ser uma resposta imunológica (resposta não clínica) ou pode ser uma resposta infecciosa (resposta clínica) ou devido à vacinação.

Exposição

O indivíduo pode ter sido exposto ao flavivírus, mas
10 não precisa mostrar sintomas visuais da infecção. O método presente detecta a exposição que pode conduzir à infecção (clínica ou subclínica ou não-clínica) ou pode indicar a exposição prévia sem os sintomas manifestados.

A presente invenção é aplicável à detecção de
15 exposição ao flavivírus ou a um equivalente do mesmo. A exposição pode ser exposição presente ou prévia ao flavivírus ou a um equivalente do mesmo. Preferivelmente, a exposição é suficiente para provocar uma reação imune ou uma resposta no corpo para induzir um parceiro de ligação
20 em resposta ao flavivírus ou ao equivalente do mesmo. Uma vez que o indivíduo é exposto, o método da presente invenção pode ser aplicado em qualquer estágio de exposição como descrito acima. Preferivelmente, o método é usado para detetar a exposição onde não há nenhum sinal e sintoma que
25 são óbvios de uma infecção de flavivírus. Preferivelmente, o método detecta a exposição do indivíduo em qualquer fase de infecção de flavivírus em uma fase aguda precoce para a infecção secundária ou estágio de convalescência posterior de exposição ao flavivírus ou equivalente do mesmo para a
30 infecção ou a vacinação primária. A exposição pode nem

sempre manifestar em uma infecção de flavivírus ou sinais ou sintomas notáveis, mas causará uma resposta para induzir um parceiro de ligação. Preferivelmente, a resposta é uma resposta imunológica.

5 **Resposta imune ou resposta imunológica**

Uma "resposta imune" ou "resposta imunológica" é compreendida como sendo uma resposta seletiva montada pelo sistema imune de vertebrados em que anticorpos específicos ou fragmentos de anticorpos e/ou de células citotóxicas são produzidos contra os patógenos e antígenos invasivos que são reconhecidos como estranhos no corpo.

Parceiro de ligação

Conseqüentemente, o "parceiro de ligação" como usado aqui é qualquer molécula ou célula que é produzida contra o flavivírus estranho ou equivalente do mesmo. Preferivelmente, é uma molécula imunoreativa. Mais preferivelmente, o parceiro de ligação é um anticorpo ou um fragmento ativo imunologicamente do mesmo, ou uma célula citotóxica. O parceiro de ligação inclui uma molécula imunointerativa que possa interagir com um antígeno de flavivírus ou um equivalente e competir com agentes imunológicos específicos de flavivírus, tais como anticorpos monoclonais específicos de flavivírus.

O parceiro de ligação preferido é uma molécula imunointerativa, que se refere preferivelmente a qualquer molécula compreendendo uma porção de ligação de antígeno ou um derivado do mesmo. Preferivelmente, a molécula imunointerativa é um anticorpo contra qualquer porção de proteínas de flavivírus produzidas durante uma resposta humoral no indivíduo de uma infecção ou de uma exposição de

flavivírus.

Mais preferivelmente, o parceiro de ligação é um anticorpo produzido no indivíduo a um flavivírus ou componentes de vírus relacionados. Entretanto, um parceiro
5 de ligação do anticorpo alvo pode também ser usado. Um exemplo de um parceiro de ligação é um anticorpo anti-idiotípico ou um anticorpo específico para e discriminatório de um anticorpo específico de indivíduo para o membro dos flavivírus ou componentes de vírus
10 relacionados. Nos estágios iniciais convalescentes de infecção de flavivírus, o anticorpo preferivelmente IgG derivado da infecção de flavivírus precedente é uma das indicações de infecção secundária ou primária de flavivírus. O anticorpo pode ser detectado pela formação de
15 um complexo entre ele e um componente do membro dos flavivírus. A formação deste imunocomplexo com o membro da IgG específica de flavivírus e o antígeno no epitopo específico de membro ou específico de flavivírus é indicado pela ausência do anexação de agentes imunológicos
20 específicos de membro ou de flavivírus competidores.

Como usado aqui, um "anticorpo anti-idiotípico" é um anticorpo que se liga ao sítio de ligação de antígeno específico de outro anticorpo gerado em resposta à exposição a um componente derivado do membro do gênero
25 flavivírus ou relativo imunológico do mesmo.

Como usado aqui, os termos "anticorpo" ou "anticorpos" incluem o anticorpo inteiro e fragmentos de anticorpo que contêm porções funcionais do mesmo. O termo "anticorpo" inclui qualquer composto monoespecífico ou biespecífico
30 compreendido de uma porção suficiente da região variável da

cadeia leve e/ou região variável da cadeia pesada para efetuar a ligação ao epitopo ao qual o anticorpo inteiro tem especificidade de ligação. Os fragmentos podem incluir a região variável de pelo menos um polipeptídeo de imunoglobulina de cadeia pesada ou leve, e inclui, mas não são limitados a, os fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$, e fragmentos Fv.

Preferivelmente o parceiro de ligação é um anticorpo. Mais preferivelmente, é uma molécula de IgG de flavivírus ou uma porção imunoreativa. Mais preferivelmente o flavivírus é o vírus da dengue ou vírus da JE.

As células Citotóxicas contidas dentro da amostra biológica podem também servir como parceiros de ligação. A célula pode interagir diretamente com o flavivírus ou qualquer componente de um lisado de célula de células infectadas com flavivírus ou um equivalente do mesmo.

Amostra biológica

O método da presente invenção detecta a exposição ao flavivírus ou equivalente do mesmo através do uso de uma amostra biológica obtida de um indivíduo que sendo potencialmente exposto ao flavivírus. A amostra biológica pode ser qualquer amostra do corpo que pode conter um parceiro de ligação. Tais amostras biológicas podem ser selecionadas do grupo que inclui sangue, saliva, líquido da coluna, células B, Células T, plasma, soro, urina e fluido amniótico. Preferivelmente, a amostra biológica é soro ou plasma ou saliva. Mais preferivelmente, a amostra biológica é soro ou saliva.

Também prefere-se que a amostra biológica seja obtida de indivíduos com suspeita de exposição a um flavivírus.

Uma amostra biológica pode também ser modificada antes do uso, tal como pela diluição, purificação de várias frações, centrifugação e semelhante.

Conseqüentemente, uma amostra biológica pode se referir a um homogeinizado, lisado ou extrato preparados de
5 um organismo inteiro ou um subconjunto de seus tecidos, células ou partes de componente, ou uma fração ou porção do mesmo.

Deve-se notar que uma amostra biológica pode também ser desprovida de um parceiro de ligação que possa
10 interagir com o flavivírus ou um equivalente do mesmo. Isto ocorre quando o indivíduo não foi exposto ao flavivírus ou a um equivalente do mesmo. Conseqüentemente a "determinação da presença de um complexo que forma entre um parceiro de
15 ligação específico de flavivírus presente na amostra biológica e um componente capturado de IgA de antinflavivírus" pode dar um resultado zero como um complexo que não pode formar na ausência de parceiros de ligação. O único complexo que pode formar neste exemplo compreenderia
20 o agente competitivo imunológico específico de flavivírus, tal como um anticorpo monoclonal projetado para competir com os parceiros de ligação na amostra biológica.

Em referência a uma amostra biológica sendo colocada em contato com um componente de um lisado, preferivelmente
25 um componente imunogênico de flavivírus ou relativo imunológico do mesmo, deve ser entendido como uma referência a qualquer método para facilitar a interação de uma ou mais moléculas imunointerativas da amostra biológica com um componente do flavivírus ou do relativo imunológico
30 do mesmo. A interação deve ser tal que o acoplamento ou a

ligação ou qualquer outra associação entre a molécula imunointerativa e um componente imunogênico específico do flavivírus ou relativo imunológico do mesmo podem ocorrer.

A amostra biológica é contatada com uma mistura de
5 componentes virais capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus ou de equivalente do mesmo.

Componente capturado de IgA antinflavivírus

A IgA de antinflavivírus é usada para capturar componentes específicos de flavivírus ou de membro.
10 Preferivelmente o componente é um componente imunológico que é reativo a um parceiro de ligação específico de flavivírus e um agente competitivo imunológico específico de flavivírus. A IgA de antinflavivírus pode ser obtida por quaisquer métodos disponíveis ao de habilidade técnica para
15 fazer anticorpos a um antígeno. Preferivelmente, a IgA é capturada por IgA antihumana.

A presente invenção usa especificamente componentes capturados de IgA de antinflavivírus ao contrário de IgG ou de IgM que geralmente resultam na perda de sensibilidade do
20 teste. Descobriu-se agora que o uso de IgA para capturar componentes de flavivírus pode melhorar a sensibilidade do teste sorológico. A IgA pode capturar componentes de flavivírus que reagem mais especificamente com o parceiro de ligação a partir da infecção e exposição recentes.

25 Quando um indivíduo é exposto ao flavivírus, o sistema imune do corpo reage para remover inicialmente o vírus. Isto causa uma cadeia de acontecimentos que se manifesta geralmente em uma resposta imunológica à pletora de antígenos apresentados pelo flavivírus ou por um
30 equivalente do mesmo. Conseqüentemente o componente

fornecido na presente invenção representa qualquer estágio de exposição ao flavivírus e pode ser um antígeno ou porção do antígeno que inclui um epítipo específico a todos os flavivírus ou ao sorotipo. Os componentes podem ser
5 derivados de qualquer fonte que inclui o próprio flavivírus. Entretanto, prefere-se que o componente seja derivado de uma célula infectada com o vírus de flavivírus. Isto pode ser derivado de uma cultura de células ou de tecido ou amostras biológicas infectadas com o flavivírus.
10 Mais preferivelmente, os componentes são derivados de uma cultura de células infectadas com o flavivírus do qual um lisado de célula é obtido.

Na presente invenção o lisado de célula preferivelmente compreende uma mistura de imunógenos de
15 flavivírus, que inclui partículas de vírus e as proteínas virais estruturais e não estruturais. Estes componentes imunogênicos são capturados pela IgA de antinflavivírus. Preferivelmente os imunógenos de flavivírus são os componentes imunogênicos do lisado que são capazes de
20 provocar uma reação imunológica a um parceiro de ligação específico de flavivírus presente na amostra biológica e aos agentes de competição imunológicos específicos de flavivírus. O lisado fornece componentes virais, preferivelmente componentes imunogênicos que podem ser
25 fornecidos pelo flavivírus em qualquer estágio de seu desenvolvimento.

O lisado da presente invenção pode ser obtido de qualquer fonte de células que foram infectadas com o membro específico dos flavivírus ou equivalente do mesmo.
30 Preferivelmente, as células são infectadas em uma *in vivo*

cultura com flavivírus ou equivalente do mesmo.

Qualquer tipo de célula pode ser infectada. Preferivelmente, o tipo de célula que é capaz de infecção e de cultura de flavivírus. Entretanto, prefere-se que as
5 células capazes de produzir títulos elevados de flavivírus sejam infectadas de acordo com os métodos da presente invenção, incluindo, mas não limitadas a, linhagem celular contínua geralmente disponível (por exemplo, células Vero (cepa Vero-PM), células CV-1, células LLC-MK2, C6/36 e AP-
10 61), de linhagens celulares primárias, tais como células de pulmão de Rhesus fetal (FRhL-2), células BSC-1, e células MRC-5, ou fibroblasto diplóide de humanos. Uma combinação de tipos de célula é também prevista pela presente invenção. As células C6/36 ou AP-61 são infectadas com
15 flavivírus ou equivalente. Mais preferivelmente o tipo de célula é C6/36.

As células podem ser cultivadas para qualquer período, preferivelmente por um período que permita que o flavivírus se estabeleça e infecte a célula. Mais preferivelmente, as
20 células são cultivadas até que um efeito citopático esteja aparente na cultura de célula que desse modo indica a infecção ativa do vírus nas células.

Neste momento, as células podem lisadas por qualquer método disponível ao técnico hábil. Preferivelmente, o uso
25 de um tampão hipotônico que inclui um detergente, tal como Triton X 100 pode ser usado fornecendo o tampão lisante que não afeta os imunógenos do flavivírus ou equivalentes do mesmo, mas preferivelmente inativa as partículas vivas de vírus.

30 Deve-se apreciar que o lisado conterá uma mistura de

componentes imunogênicos virais incluindo os antígenos de vírus de flavivírus estrutural e não estruturais, assim como partículas inteiras de vírus de flavivírus. Para o vírus da dengue estes podem ser selecionados de grupo que
5 inclui DEN 1, 2, 3 ou 4. A presente invenção procura identificar uma mistura de antígenos por uma mistura de parceiros de ligação que são gerados na amostra biológica em resposta à exposição ao flavivírus ou a um equivalente.

Preferivelmente o flavivírus é vírus da dengue ou
10 vírus da JE.

Mais preferivelmente o componente imunogênico específico de dengue ou flavivírus é uma proteína estrutural ou não estrutural de vírus de flavivírus ou de dengue. Mais preferivelmente, a proteína estrutural é
15 selecionada do grupo que inclui as proteínas de C-Capsídeo, de M-Membrana e de E-Envelope, que podem ser capturada por IgA de antinflavivírus. Mais preferivelmente, as proteínas não estruturais para a dengue são selecionadas do grupo que inclui NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5.

20 O lisado pode ser processado em qualquer maneira. Preferivelmente, o lisado é clarificado para remover os núcleos e resíduos celulares e as partículas inteiras de flavivírus. O lisado pode separado em alíquotas e armazenado em -70°C a -80°C para uso futuro.

25 Para o vírus da dengue os métodos precedentes usaram o DEN 1, 2, 3 e 4 de antígenos de dengue específicos (presentes no sobrenadante de células infectadas de vírus da dengue) para detectar os anticorpos indicativos de infecção de vírus da dengue. Entretanto, a presente
30 invenção não usa unicamente estes antígenos, mas uma

mistura de moléculas/imunógenos de flavivírus (presente nas células infectadas flavivírus, que podem conter as partículas de flavivírus e outros componentes imunológicos, preferivelmente proteínas estruturais e não estruturais)
5 contra quais anticorpos se desenvolvem no curso de uma exposição de flavivírus.

Agente competitivo imunológico específico de flavivírus

O agente imunológico, preferivelmente um anticorpo ou anticorpo monoclonal é usado para competir com o parceiro
10 de ligação presente na amostra biológica. O agente imunológico é também reativo aos componentes específicos de flavivírus. Qualquer agente imunológico que é específico para o flavivírus ou mais preferivelmente a um epitopo do flavivírus é preferido. Geralmente o agente imunológico
15 será específico ao epitopo na porção de envelope do vírus de flavivírus. Mais preferivelmente, o agente competitivo imunológico específico de flavivírus é específico para um componente capturado de IgA de antinflavivírus.

Uma vez que o agente imunológico for competir com o
20 agente de ligação específico de flavivírus, também prefere-se que o agente imunológico e o agente de ligação específico de flavivírus passem a competir por pelo menos um ou o mesmo epitopo. Conseqüentemente prefere-se que o agente imunológico seja específico a um epitopo dos
25 componentes capturados de IgA de antinflavivírus. Uma combinação de Componentes capturados de IgA e um agente imunológico altamente específico melhorará a especificidade do teste ao membro do gênero flavivírus.

A especificidade no teste pode ser melhorada pelo grau
30 de especificidade dos agentes de competição imunológicos

específicos de flavivírus. Preferivelmente o agente competitivo imunológico específico de flavivírus é um anticorpo, tal como um anticorpo policlonal ou um anticorpo monoclonal. Mais preferivelmente é um anticorpo monoclonal específico para um epitope do flavivírus, mais especificamente a um componente capturado de IgA antinflavivírus.

Sabendo que o antígeno para o qual o anticorpo é gerado, o antígeno do componente pode ser identificado.

Quaisquer métodos disponíveis ao técnico hábil podem ser usados para fazer um anticorpo ou anticorpo monoclonal ao vírus de flavivírus.

Formação de complexo

Os componentes e a amostra biológica são contatados, de modo que possam formar um complexo entre os componentes e o parceiro de ligação presentes dentro da amostra biológica. Preferivelmente, os imunógenos das partículas de flavivírus, incluindo, mas não limitados às proteínas estruturais e não estruturais capturadas por IgA de antinflavivírus que tem um epitopo específico para flavivírus, formarão complexos com os parceiros de ligação ou um agente competitivo imunológico específico de flavivírus. Preferivelmente, os parceiros de ligação específicos são anticorpos ou fragmentos do mesmo presentes na amostra biológica. Estes estarão somente presente quando o indivíduo foi exposto/imunizado ao flavivírus.

Preferivelmente, o complexo formará entre um anticorpo, preferivelmente uma IgG específico para o membro do gênero flavivírus ou equivalente do mesmo e um componente viral de flavivírus capturado de IgA

antiflavivírus.

O parceiro de ligação pode também ser uma célula citotóxica, tal como uma T célula citotóxica da amostra biológica que reage aos imunógenos de flavivírus.

5 Um agente competitivo imunológico específico de flavivírus ou de membro também formará um complexo com o componente se o mesmo epitopo permanecer livre no componente. Onde o parceiro de ligação e o agente imunológico são específicos para o mesmo epitopo, uma
10 competição acontecerá, manifestando-se em uma indicação da presença do parceiro de ligação e de exposição prévia ao flavivírus.

O método preferido da presente invenção se baseia na detecção de agente competitivo imunológico específico de
15 flavivírus ou membro com os parceiros de ligação específicos de flavivírus presentes na amostra biológica. O agente imunológico de competição e parceiro de ligação específico de flavivírus ou membro competem para um componente do antígeno de flavivírus presente no lisado de
20 célula derivado de uma célula infectada com o flavivírus ou um equivalente do mesmo que foi capturado usando IgA de antiflavivírus. O complexo pode compreender um ou mais parceiros de ligação limitados a um ou mais componentes derivados de flavivírus ou um equivalente do mesmo.

25 A amostra biológica é deixada em contato com o componente derivado de flavivírus ou um equivalente do mesmo por um período de tempo suficiente e condições, que permitem a formação estável de um complexo e inibem a anexação de agente imunológico competitivo, tal como um
30 anticorpo monoclonal específico para o flavivírus ou

qualquer o membro particularmente do gênero.

Uma vez que anexado, o agente competitivo imunológico específico de flavivírus pode ser adicionado. Conseqüentemente, prefere-se ter uma etapa de pré-incubação
5 onde o agente de ligação e o componente sejam permitidos formar um complexo antes da adição do agente imunológico. Entretanto, estes componentes podem também ser adicionados simultaneamente.

A invenção utiliza preferivelmente um flavivírus
10 específico ou qualquer anticorpo específico de membro particular para competir com os parceiros de ligação, tais como o antinflavivírus específico ou qualquer membro particular específico de IgG a partir do corpo hospedeiro para um específico epitopo ao flavivírus ou qualquer membro
15 particular do gênero ou a seus sorotipos presentes na proteína de envelope de flavivírus derivada de um lisado de célula, que inclua uma mistura de componentes imunogênicos de flavivírus incluindo partículas de flavivírus dentre outros antígenos indicativos de infecção de flavivírus.

20 Os métodos e kits da presente invenção procuram detectar os componentes e parceiros de ligação, que formam complexos e são indicativos de uma infecção de flavivírus. Estes componentes e parceiros de ligação são gerados no curso de uma infecção de flavivírus.

25 Em ainda outro aspecto, a amostra biológica pode ser aplicada a um suporte sólido, tal como, mas sem limitar a, uma membrana de nitrocelulose ou placa de poliestireno revestida com IgA de antinflavivírus. O suporte sólido pode também ter o componente capturado por IgA antihumana e
30 derivado do flavivírus ou um equivalente do mesmo aplicado

a ela. O componente derivado de um flavivírus ou equivalente do mesmo é deixado então em contato com a amostra biológica por um período de tempo suficiente e sob condições, que permitem a formação estável de um complexo na presença de agentes imunológicos competidores específicos ao flavivírus ou quaisquer membros do gênero. Uma vez que o complexo é formado, um sistema de detecção é então adicionado para facilitar a detecção da ligação específica do agente imunológico no complexo.

10 ***Determinando a presença de um complexo***

Detectar o complexo entre a IgA de antinflavivírus capturada de componentes virais de flavivírus derivados do flavivírus e um parceiro de ligação específico de flavivírus, tal como uma molécula imunoreativa ou um agente imunológico específico de flavivírus, pode ser baseado em qualquer método conveniente, que seja conhecido àqueles de habilidade na técnica.

É conhecido que os procedimentos úteis para detectar componentes capturados de IgA de antinflavivírus, parceiros de ligação e agentes imunológicos específicos de flavivírus, tais como os anticorpos monoclonais que formam complexos e são indicativos de uma infecção de flavivírus em uma amostra biológica incluem, mas não estão limitados a, ensaios imunológicos, tais como imunoblotting, imunocitoquímico, imunohistoquímico ou cromatografia de afinidade de anticorpo, análise de Western blot, ou variações ou combinações destes ou outras técnicas como conhecida na técnica.

Em uma modalidade preferida, o método de detecção emprega um agente de detecção adicional, tal como

anticorpos específicos e anti- anticorpos conjugados com enzima, ou simplesmente utilização de um agente imunogênico ligado diretamente a um grupo reportador, tal como uma enzima. Uma enzima apropriada é peróxido de rábano (HRP) que permite a detecção dos complexos formados com componentes competidores. Para especificidade adicionada, os anticorpos monoclonais podem ser empregados.

A presente invenção inclui o uso de um agente imunológico específico de flavivírus ou de membro de flavivírus que tenha um grupo reportador. O uso deste melhora a velocidade que o teste pode ser realizado. Reduz o número de etapas exigidas para identificar a formação de complexo. Um grupo reportador apropriado é uma enzima, tal como HRP. Outros grupos reportadores apropriados podem ser usados e são familiares àqueles de habilidade na técnica.

O complexo formado por um componente do lisado de célula e o parceiro de ligação pode ser detectado usando um agente de detecção que contenha um grupo reportador e o ligue especificamente ao componente/complexo de parceiro de ligação. Tal agente de detecção pode compreender, por exemplo, o anticorpo específico de flavivírus ou específico de membro derivado de outra espécie de animais ou de outros agentes que se ligam especificamente ao parceiro de ligação, tal como uma anti-imunoglobulina (isto é, anticorpo), proteína G, proteína A ou uma lecitina. Alternativamente, um ensaio competitivo pode ser utilizado, em que um agente de detecção capaz de ligar um antígeno derivado do membro de flavivírus, é marcado com um grupo reportador e permitido se ligar ao componente imobilizado do lisado de célula em combinação com o parceiro de ligação

da amostra biológica. A extensão a qual o parceiro de ligação da amostra biológica inibe a ligação do flavivírus marcado ou agente de detecção específico de membro de flavivírus ao componente imobilizado é indicativo da reatividade do parceiro de ligação da amostra biológica com o componente imobilizado.

Em uma modalidade preferida, o reagente de detecção é um anticorpo ou anticorpo secundário ou um fragmento ligador de antígeno do mesmo, capaz de ligar ao parceiro de ligação da amostra biológica. Os anticorpos podem ser preparados por qualquer de uma variedade de técnicas conhecidas àquelas de habilidade ordinária na técnica (veja, por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Geralmente, os anticorpos podem ser produzidos pelas técnicas de cultura de célula, incluindo a geração de anticorpos monoclonais, ou através de transfecção de genes de anticorpo em hospedeiros de célula bacteriana ou mamífera apropriados, a fim de permitir a produção de anticorpos recombinantes.

O anticorpo secundário, que pode ser conjugado a um marcador, pode ser adicionado ao complexo para facilitar a detecção. Uma faixa de marcadores que fornecem um sinal detectável pode ser empregada. O marcador pode ser selecionado de um grupo que inclui cromógeno, uma enzima, um catalizador, um marcador visual fluoróforo e direto. No caso de um marcador visual direto, pode-se usar uma partícula metálica coloidal ou não metálica, uma partícula de tintura, uma enzima ou um substrato, de um polímero orgânico, ou de uma partícula de látex. Um grande número de enzimas apropriadas para o uso como marcadores são

divulgadas na patente dos Estados Unidos no. 4366241, 4843000 e 4849338. Os marcadores de enzima apropriados na presente invenção incluem fosfatos alcalinos, peroxidase de rábano, preferivelmente peroxidase de rábano. O marcador de enzima pode ser usado sozinho ou em combinação com uma segunda enzima que esteja na solução. Na presente invenção um anticorpo secundário anexado com peroxidase de rábano, que então reage com seu substrato OPD ou DAB e produz uma mudança de cor visualmente detectável, preferivelmente alcança a detecção do complexo que formou com os imunógenos e os agentes imunológicos específicos de flavivírus competitivo ou de membro de flavivírus, tais como os anticorpos monoclonais específicos para flavivírus ou qualquer membro do gênero.

15 Apresentação dos componentes capturados de IgA de antinflavivírus

Em uma modalidade preferida, os métodos como descrito aqui envolvem o uso de um lisado de célula derivado de uma célula infectada com um flavivírus ou um membro de flavivírus do gênero, ou os componentes capturados de IgA de antinflavivírus (referidos aqui permutavelmente como "components" ou "componentes do lisado de célula"), imobilizado em um suporte sólido, tal como uma membrana de poliestireno ou de nitrocelulose a qual um parceiro de ligação presente em uma amostra biológica pode se ligar.

Conseqüentemente em um outro aspecto da presente invenção é fornecido um suporte sólido para o uso em um método para detecção de exposição de um indivíduo a um flavivírus ou equivalente do mesmo, o referido método compreendendo:

contatar uma amostra biológica a partir do indivíduo com uma mistura de componentes capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus ou de um equivalente;

submeter a amostra biológica e os componentes
5 capturados de IgA de antinflavivírus a um agente competitivo imunológico específico de flavivírus

determinar a presença de um complexo que se forma entre um parceiro de ligação específico de membro de flavivírus ou flavivírus presente na amostra biológica e em
10 um componente capturado de IgA de antinflavivírus na presença do agente competitivo imunológico específico de flavivírus;

o referido suporte compreendendo componentes capturados de IgA de antinflavivírus imobilizados no
15 suporte.

O suporte sólido pode ser qualquer material conhecido àqueles de habilidade ordinária na técnica ao qual um parceiro ou um componente de ligação do lisado de célula podem ser anexados. Por exemplo, o suporte sólido pode ser
20 um poço de teste em uma placa de microtítulo ou uma nitrocelulose ou outra membrana apropriada. Alternativamente, o suporte pode ser um grânulo ou um disco, tal como vidro, fibra de vidro, látex ou um material plástico, tal como poliestireno ou polivinilcloreto. O
25 suporte pode também ser uma partícula magnética ou um sensor de fibra óptica, tal como aquelas divulgadas, por exemplo, na US-PAT. No.5.359.681.

O parceiro de ligação ou o componente do lisado de célula podem ser imobilizados no suporte sólido usando uma
30 variedade de técnicas conhecidas àqueles de habilidade na

técnica, que são descritas amplamente na patente e na literatura científica. No contexto da presente invenção, o termo "imobilização" refere-se a imuno-absorção ou associação não-covalente, tal como adsorção, e anexação covalente (que pode ser uma ligação direta entre o antígeno ou nucleotídeo e grupos funcionais no suporte, ou pode ser uma ligação por um agente de reticulação). A imobilização pela imuno-absorção com anticorpo revestido a um poço em uma placa de microtítulo ou uma absorção simples a uma membrana é preferida. Nesses casos, a adsorção pode ser conseguida contatando o parceiro de ligação ou um componente do lisado de célula, em um tampão apropriado, com o suporte sólido previamente revestido com o anticorpo para uma quantidade de tempo apropriada. O tempo de contato varia com a temperatura, mas é tipicamente cerca de 1 hora e durante a noite.

A Imuno-anexação de um parceiro de ligação, um componente capturado de IgA antinflavivírus ou um agente imunológico específico de flavivírus ou de membro a uma suporte sólido pode também ser conseguido primeiramente reagindo o suporte com um reagente bifuncional que reaja com o anticorpo revestido e um componente imunogênico, tal como epitopo não específico, de um parceiro de ligação ou de um componente. Por exemplo, o parceiro de ligação, de um componente capturado de IgA antinflavivírus ou um agente imunológico específico de flavivírus pode ser imunologicamente anexado aos suportes que têm um revestimento de anticorpo apropriado usando o anti-anticorpo.

30 *Descrição geral do processo*

O seguinte é uma descrição geral do método meramente para ilustrar determinadas modalidades preferidas, mas a invenção não deve ser restringida a esta descrição geral nem ao vírus da dengue. O vírus da dengue é meramente um
5 flavivírus preferido para finalidades de ilustração de um flavivírus para a invenção.

O ensaio pode ser conduzido como um ensaio sanduíche de duas etapas. Este ensaio pode ser realizado primeiramente contatando um parceiro de ligação específico
10 de dengue presente em uma amostra biológica que foi imobilizado em um suporte sólido (este pode ser o poço de uma placa de microtítulo), com o componente de um lisado de célula como descrito aqui, de modo que um componente é permitido ligar ao parceiro de ligação imobilizado. A
15 amostra não ligada é então removida do complexo imobilizado e um reagente de detecção (preferivelmente um segundo anticorpo capaz de ligar ao parceiro de ligação ou ao componente, contendo um grupo reportador) é adicionado. A quantidade de reagente de detecção que permanece ligado ao
20 suporte sólido é determinada então usando um método apropriado para o grupo reportador específico.

Mais preferivelmente, uma vez que o parceiro de ligação ou um componente do lisado de célula é imobilizado no suporte como descrito acima, os locais de ligação
25 restantes no suporte são tipicamente bloqueados. Qualquer agente de bloqueio apropriado conhecido àqueles de habilidade ordinária na técnica, tal como a albumina de soro bovino ou leite de pele com Triton X 100 ou Tween 20TM (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.). O parceiro de ligação
30 imobilizado ou componente é então incubado com um

componente de um lisado de célula ou parceiro de ligação, respectivamente, tal que um complexo entre o parceiro de ligação e o componente é permitido formar. O componente ou o parceiro de ligação podem também ser diluídos com um
5 tampão de diluente apropriado, tal como salino de tampão fosfato (PBS) com o soro humano negativo de anticorpo de dengue e Triton X 100 ou Tween 20 antes da incubação. Geralmente, um tempo de contato apropriado (isto é, tempo de incubação) é um período de tempo preferivelmente de 30
10 minutos que é suficiente para permitir um componente do lisado de célula se ligar ao parceiro de ligação imobilizado, ou vice versa, e então agente imunológico competitivo, tal como um anticorpo ao vírus da dengue, mais preferivelmente um anticorpo monoclonal é adicionado à
15 mistura para o ensaio competitivo e é deixado trabalhar por outros 30 minutos. O agente imunológico competitivo pode ter um grupo reportador diretamente ligado a ele. Preferivelmente, o tempo de contato é suficiente para conseguir um nível de ligação ao epitopo alvo no antígeno
20 de dengue anexado que é, pelo menos aproximadamente 95% daquele conseguido em equilíbrio entre o parceiro ou componente de ligação ligado ou não ligado do lisado de célula. Aqueles de habilidade ordinária na técnica reconhecerão que o tempo necessário para conseguir o
25 equilíbrio pode prontamente ser determinado pelo ensaio do nível de ligação que ocorre durante um período de tempo. Em temperatura ambiente, um tempo de incubação de aproximadamente 30 a 60 minutos é geralmente suficiente.

Os componentes não ligados podem então ser removidos
30 lavando o suporte sólido com um tampão apropriado, tal como

PBS contendo 0,05% Tween 20™ ou Tween 80. Um agente de detecção que é capaz de ligar ao componente do lisado de célula ou parceiro de ligação, e que contenha um grupo reportador, pode então ser adicionado ao suporte sólido. O agente de detecção é incubado então com o complexo parceiro-componente de ligação imobilizado para uma quantidade de tempo suficiente para detectar o componente ligado ou parceiro de ligação. Uma quantidade de tempo apropriada pode geralmente ser determinada analisando o nível de ligação, isso ocorre durante um período de tempo. O agente de detecção não ligado é então removido e agente de detecção ligado é detectado usando o grupo reportador. O método empregado para detecção do grupo reportador depende da natureza do grupo reportador.

Alternativamente, um grupo reportador pode ser ligado diretamente ao agente imunológico. O grupo reportador pode então ser detectado imediatamente. Para grupos radioativos, a contagem de cintilação ou métodos autoradiográficos são geralmente apropriados. Os métodos espectroscópicos podem ser usados para detectar tinturas, grupos liminescentes, enzimas cromogênicas e grupos fluorescentes. As enzimas cromogênicas incluem, mas não são limitadas a, peroxidase e fosfatase alcalina. Os grupos fluorescentes incluem, mas não são limitados a, isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), rodamina, Texas Red e ficoeritrina. A biotina pode ser detectada usando avidina, acoplada a um grupo reportador diferente (geralmente um grupo radioativo ou fluorescente ou uma enzima). Os grupos reportadores de enzima podem geralmente ser detectados pela adição de substrato (geralmente por um

período de tempo específico), seguido por espectroscopia ou outra análise dos produtos de reação. O substrato pode ser selecionada de um grupo de agentes consistindo de 4-cloro-1-naftol (4CN), diaminobenzidina (DAB), carbazola de aminoetila (AEC), 2,2'azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS), ofenilenodiamina (OPD) e benzidina tetrametila (TMB).

Pode também ser desejável acoplar mais de um grupo reportador a um agente de detecção. Em uma modalidade, grupos reportadores múltiplos são acoplados a uma molécula de agente de detecção. Em uma outra modalidade, mais de um tipo de grupo reportador pode ser acoplado a um agente de detecção. Não obstante da modalidade particular, os agentes de detecção com mais de um grupo reportador podem ser preparados em uma variedade de maneiras. Por exemplo, mais de um grupo reportador pode ser acoplado diretamente a um agente de detecção, ou ligantes que forneçam múltiplos locais para a anexação podem ser usados.

Em uma modalidade relacionada, o método como descrito aqui pode ser realizado em uma placa de poliestireno ou fluxo-livre (*flow-through*) ou formato de teste de fita, onde o parceiro de ligação de uma amostra biológica ou de um componente é imobilizado pelo anticorpo antidengue ou em uma membrana, tal como nitrocelulose. No teste de fluxo-livre, por exemplo, um componente é capaz de ligar ao parceiro de ligação imobilizado a medida que a amostra passa através da membrana. Alternativamente, um parceiro de ligação presente em uma amostra biológica é capaz de ligar ao componente imobilizado do lisado de célula a medida que a amostra passa através de membrana. Um segundo, agente de

detecção marcado se liga então ao complexo parceiro-componente de ligação enquanto uma solução que contém o agente de detecção flui através da membrana. A detecção do agente de detecção ligado pode então ser realizada como
5 descrito acima.

No formato de teste de fita, uma extremidade da membrana a qual um componente do lisado de célula é ligado é imersa em uma solução que contém a amostra biológica. O parceiro de ligação na amostra biológica migra ao longo da
10 membrana através de uma região que contém um agente de detecção e até a área do componente imobilizado. A concentração de agente de detecção na área do complexo parceiro-componente de ligação imobilizado indica a presença de agente de ligação em uma amostra biológica.
15 Tipicamente, a concentração do reagente de detecção nesse local gera um padrão, tal como uma linha, que possa ser lida visualmente. A ausência de tal padrão indica um resultado negativo. Geralmente, a quantidade de parceiro de ligação imobilizado na membrana ou placa de poliestireno é
20 selecionado para gerar um padrão visualmente discernível quando a amostra biológica contém um nível de um agente de ligação que seja suficiente para gerar um sinal positivo no ensaio sanduíche, no formato discutido acima. Tais testes podem tipicamente ser realizados com uma quantidade muito
25 pequena de amostra biológica.

Em uma versão mais simples do teste de fita ou teste de bastão de aferição, os componentes do lisado de célula podem ser imobilizados em uma membrana, tal como uma membrana de nitrocelulose. As fitas de membrana podem então
30 ser submetidas às amostras biológicas para formar complexos

entre os componentes e um parceiro de ligação presentes na amostra biológica. O complexo é então detectável por quaisquer meios descritos acima usando um agente de detecção, tal como um anticorpo monoclonal. O teste de
5 bastão de aferição pode fornecer uma indicação rápida de exposição precedente sem usar grandes amostras biológicas.

Como usado aqui, "ligação" se refere a uma associação não-covalente ou uma ligação imunológica entre duas moléculas separadas de modo que um complexo é formado. A
10 habilidade de ligar pode ser avaliada pela, por exemplo, determinação de uma constante de ligação para a formação do complexo. A constante de ligação é o valor obtido quando a concentração do complexo é dividida pelo produto das concentrações componentes. Geralmente, dois compostos são
15 ditos para se "ligar", no contexto da presente invenção, quando a constante de ligação para a formação de complexo exceda aproximadamente 10^3 L/mol. A constante de ligação pode ser determinada usando métodos bem conhecidos na técnica.

20 Os suportes sólidos contemplados pelo método e kits da presente invenção incluem qualquer superfície a qual o parceiro de ligação, componentes derivados do flavivírus ou qualquer membro específico do grupo ou equivalente do mesmo ou um agente competitivo imunológico específico de
25 flavivírus podem imobilizar usando imuno-absorção. Os exemplos de superfícies incluem sem serem limitados a, poliestireno ou membranas incluindo membranas de nitrocelulose, filtros de membrana de politetrafluoretilene, filtros de membrana de acetato de
30 celulose e filtros de membrana de nitrato de celulose com

carreadores de papel de filtro. Mais preferivelmente, a membrana é poliestireno e a membrana é membrana de nitrocelulose.

Alternativamente, os métodos de diagnóstico da presente invenção podem adotar um método analítico automatizado usando um microchip biológico. Por exemplo, um kit de diagnóstico pode ser estruturado para realizar imunoblotting usando um dispositivo de vidro revestido com o componente do lisado de célula. Este kit de diagnóstico pode compreender um microchip biológico na superfície da qual o componente do lisado de célula é imobilizado, um tampão apropriado, uma amostra padronizada compreendendo um nível detectável de agente de ligação, e um reagente de detecção secundário, como descrito aqui.

O método e kits da presente invenção podem detectar a exposição específica de humanos ou animais a um flavivírus ou qualquer membro específico da família ou equivalente do mesmo, durante a infecção aguda ou em fase convalescente. Como usado aqui, "infecção aguda" se refere ao período de tempo quando um vírus infectou um hospedeiro e está ativamente replicante e/ou causando os sintomas associados com a infecção como febre, vermelhidão, dor nas articulações e ou dor abdominal. A "fase convalescente" se refere ao estágio de ciclo de infecção de flavivírus quando o vírus de flavivírus já não está se multiplicando ou permanece no sangue hospedeiro e desenvolveu parceiros de ligação tal como, mas não limitado aos anticorpos. Usando o método e o kit da presente invenção, a exposição pode ser detectada a qualquer hora após a geração de um parceiro de ligação no paciente infectado ou paciente derivado de

infecção/infecções precedentes.

Kits

Em um outro aspecto da presente invenção é fornecido um kit para detecção de exposição de um indivíduo a um
5 flavivírus ou qualquer membro da família ou equivalente do mesmo, o referido kit compreendendo:

componentes capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus;

agente competitivo imunológico específico de
10 flavivírus; e

pelo menos um agente de detecção para detectar um complexo que se forma entre um parceiro de ligação presente em uma amostra biológica e um componente capturado de IgA de antinflavivírus na presença do agente competitivo
15 imunológico específico de flavivírus.

Opcionalmente, o kit também inclui partes adicionais, tais como tampões de lavagem, recipientes de incubação, tampões de bloqueio e instruções como são necessárias para conduzir o método.

20 Conseqüentemente a presente invenção fornece um kit para detecção de exposição de um indivíduo ao flavivírus ou qualquer membro da família ou um equivalente do mesmo. O kit pode ser qualquer forma conveniente que permiti um parceiro de ligação em uma amostra biológica interagir com
25 um componente viral de flavivírus capturado de IgA de antidengue e ainda competir com um agente competitivo imunológico específico de flavivírus. O resultado é uma indicação, pela presença de flavivírus específico ou de parceiros de ligação específicos de flavivírus na amostra
30 biológica, de exposição prévia ao flavivírus.

Preferivelmente o kit compreende um suporte sólido, tal como descrito aqui adaptado para receber ou compreender componentes capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus ou um equivalente do mesmo. O kit pode
5 compreender também reagentes, moléculas reportadoras capazes de fornecer sinais detectáveis e opcionalmente instruções para o uso. O kit pode ser em forma modular onde os componentes individuais podem ser separadamente comprados.

10 O kit pode ser um kit modular compreendendo um ou mais membros onde pelo menos um membro é um suporte sólido compreendendo um componente de flavivírus capturado de IgA de antinflavivírus de flavivírus ou equivalente ou lisado de célula compreendendo um componente imunogênico derivado de
15 um flavivírus ou um equivalente do mesmo.

Em uma modalidade alternativa o suporte sólido compreende um arranjo de parceiros de ligação para um ou mais componentes de um ou mais flavivírus ou equivalente do mesmo de um ou mais indivíduos.

20 A presente invenção também fornece componentes individuais do kit para o uso no método da presente invenção. A invenção fornece suportes sólidos incluindo componentes capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus para o uso na detecção de exposição ao
25 flavivírus. Em uma modalidade, a invenção fornece uma placa de 96 poços de poliestireno ou uma membrana de nitrocelulose para anexar antígeno viral, para o uso como componentes virais de flavivírus capturados de IgA de antinflavivírus imobilizados ou como um ponto de blot ou o
30 uso como uma bastão de aferição, que inclui componentes de

flavivírus ou equivalente do mesmo. Preferivelmente, a placa ou as membranas incluem os componentes selecionados do grupo que inclui proteínas estruturais e não estruturais de flavivírus, partículas de flavivírus e fragmentos do mesmo, glicoproteínas, lipídeos e carboidratos derivados do flavivírus ou qualquer mistura do mesmo.

O suporte sólido pode ser também uma placa de microtítulo, dispositivo de vidro ou microchip biológico onde os componentes do lisado de célula são imobilizados. Estes suportes sólidos podem ser, então submetidos à amostra biológica para detecção de exposição de flavivírus. Preferivelmente a placa de microtítulo de poliestireno é usada para anexar antígeno de flavivírus por imunopurificação usando IgA de antinflavivírus do lisado de célula infectado flavivírus.

No caso de uma membrana de nitrocelulose, o segundo suporte pode ser um aparador, que apara o suporte sólido para melhorar a manipulação do suporte sólido, que imobilizou componentes do flavivírus. Por exemplo, a membrana de nitrocelulose pode ser suportada em um bastão que permite a membrana de ser mergulhada em uma amostra biológica tal como o soro. Isto é útil como um componente de um kit já que as pequenas quantidades de amostra biológica podem ser testadas simultaneamente.

Avaliando o risco relativo de infecção

Em ainda um outro aspecto, a presente invenção também fornece um método de avaliação do risco relativo de um ou mais indivíduos sendo expostos ao flavivírus ou qualquer membro da família ou um equivalente do mesmo dentro de uma localização definida (por exemplo, área geográfica,

moradia, meio de transporte ou centro para o tratamento médico ou avaliação), compreendendo:

a) obter amostras de uma população representativa dentro de uma localização definida; e

5 b) avaliar a exposição de membros individuais de uma população de amostra a um flavivírus ou qualquer membro da família ou equivalente do mesmo pelo método compreendendo as etapas de -

10 i) contatar uma amostra biológica de um indivíduo com um componente capturado de IgA de antinflavivírus derivado do flavivírus ou equivalente do mesmo para formar um complexo entre o componente e um parceiro de ligação específico de flavivírus presentes na amostra biológica;

15 ii) determinar a presença do complexo que forma entre um parceiro de ligação específico de flavivírus presente na amostra biológica e um componente capturado de IgA de antinflavivírus na presença de um agente competitivo imunológico específico de flavivírus, onde a presença do complexo é indicativa de exposição do indivíduo a um
20 flavivírus ou qualquer membro da família ou equivalente do mesmo; e

iii) avaliando o risco relativo de exposição dentro da localização definida.

A análise de risco pode ser conduzida usando o
25 software em uma forma lida por computador. Conseqüentemente, a presente invenção ainda relaciona-se a um programa lido por computador e computador compreendendo apropriado para analisar a exposição de indivíduos ou grupo de indivíduos ou um risco de exposição de indivíduo ou
30 grupo de indivíduos a um flavivírus ou equivalente do

mesmo.

O método ou a técnica da presente invenção permite o estudo epidemiológico ou a soro-vigilância das manifestações de infecção causadas pelo flavivírus ou qualquer membro da família ou equivalente do mesmo. Tais estudos fornecem a informação valiosa, que avança múltiplas facetas de pesquisa na área de doença de flavivírus. Por exemplo, auxílio de estudos epidemiológicos na identificação do índice de uma infecção. Tal informação permite a identificação de uma localização definida da qual a fonte de vírus responsável para uma manifestação viral originou.

Adicionalmente a técnica/método da presente invenção permite para a identificação ou isolamento rápido dos indivíduos que são infectados com um flavivírus ou equivalente do mesmo sem equipamento de laboratório principal ou mesmo em condições de campo. Tais auxílios de informação na identificação dos indivíduos, que exigem tratamento médico assim como a definição das posições que exigem posterior investigação ou abordagens de controle de doenças, tal como a identificação de lugares de criação e seu controle. Adicionalmente, a técnica da presente invenção permite a monitoração de um paciente infectado para determinar a presença de IgG específico de antinflavivírus. A redução do título de IgG ou sua presença em uma fase inicial de infecção pode ser a indicação de infecção secundária e assim, ajudar a monitoração das fases subsequentes de infecção de flavivírus como a febre hemorrágica de dengue (DHF) ou síndrome de choque de dengue (DSS).

Adicionalmente, a técnica da presente invenção fornece meios para identificação dos indivíduos que são infectados com qualquer membro específico do gênero de flavivírus e sorotipos envolvidos, permitindo a detecção rápida, risco de infecção adicional, apontando à localização de uma estratégia de controlo de infecção e doenças.

Uma referência aqui a um documento de patente ou outra matéria que é dada como a técnica anterior não deve ser levada como uma admissão que o documento ou a matéria sejam conhecidos ou que a informação que contém fosse parte do conhecimento geral comum como na data de prioridade de qualquer das reivindicações.

Os exemplos dos procedimentos usados na presente invenção serão descritos agora mais inteiramente. Deve-se compreender, entretanto, que a seguinte descrição é ilustrativa somente e não deve ser tomada de nenhuma maneira como uma limitação na generalidade de invenção descrita acima.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - C-ELISA para a detecção de dengue IgG específica

1. Materiais e métodos

1.1 Preparação de antígenos de lisado virais para C-ELISA: Os antígenos virais de dengue de lisado foram preparados contra todos os quatro sorotipos de vírus da dengue de acordo com o método descrito por Cardoso e outros, 2002. Momentaneamente, os vírus da dengue (5 m.o.i.) foram crescidos nas células C6/36 com o meio de manutenção de vírus que contém 2% de soro de vitela fetal foi incubado de 4 a 5 dias dependendo do desenvolvimento de

efeitos citopáticos e de sorotipos do vírus. O meio foi decantado e o frasco com as células infectadas foi lavado quatro vezes com PBS, tratado com 1 ml de tampão hipotônico com 1% de trix100 por uma hora e finalmente centrifugado em 14000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado, testado contra os anticorpos monoclonais específicos de sorotipo e específico de grupo de dengue por ELISA indireto, e 500µl alocados em eppendrofs e armazenados em -70°C até o uso.

1.2 Anticorpos monoclonais: MAbs específicos de dengue pan foram obtidos de duas fontes diferentes (Abcam, Oxford, UK e Immunology Consultants Limited, USA) e ambos MAbs foram certificado por CDC, Atlanta, USA. MAbs específicos sorotipos de dengue (den-1. den-2. den-3 e den-4) foram obtidos do ICL, USA. As reatividades de todos os MAbs contra quatro sorotipos de isolados de Singapura também foram avaliados por ELISA indireto e imunoensaio de dot-blot.

1.3 Soros de teste: Um total de 360 amostras de soro foram usadas neste estudo. Estas amostras foram recebidas de diferentes clínicas e hospitais para o diagnóstico de infecção de dengue usando PCR ou isolamento de vírus ou ensaios sorológicos. A presença de anticorpos reativos de dengue (IgG) na amostra foi inicialmente selecionada usando dois tipos de ELISAs indiretos de IgG de vírus da dengue (Pan-bio, Austrália e IVD Research, Inc, Carlsbad, CA 92008, EUA) e o nível de IgG foi então determinado usando dot-blot EIA por diluições em série. Todas as amostras foram preservadas em -80°C até que fossem testadas por C-ELISA.

1.4 ELISA indireto: Três tipos de ELISAs indiretos foram usados neste estudo. Os kits comerciais (Pan-bio, Austrália e IVD Research Inc, Carlsbad, CA 92008, EUA) foram usados para a seleção de anticorpos reativos de IgG de vírus da dengue em amostras de soro e testes foram realizados de acordo com os procedimentos descritos pelos fabricantes. No ELISA indireto da casa foi usado para avaliar o MAb e determinar o antígeno viral, MAb e diluições de soro ótimos para o uso no ensaio competitivo.

ELISA indireto foi realizado em placas de poliestireno maxi-sorb de 96 poços. AS placas de microtítulo de fundo chato de 96-poços maxi-sorb (NUNC, Dinamarca) e volumes de 100µl de reagentes foi usado durante o ensaio. As placas de ELISA foram revestidas com 100µl por poço de IgA antihumana na diluição 1:500 em tampão de carbonato/bicarbonato (Fluka, Biochemika, Switzerland) em pH 9,6 e incubadas em 37°C por 1 hora ou durante a noite em 4°C. As placas foram lavadas uma vez com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e 100µl de IgA antidengue em uma diluição ótima predeterminada (1:5000) em PBS foram adicionado à cada poço. As placas foram incubadas por 1 hora em 37°C e lavadas novamente, uma vez e 100µl de antígenos de lisado de dengue (Den-1 a Den-4) na diluição predeterminada de 1:100 em PBS foi adicionado a cada poço e incubado outra vez em 37°C por 1 hora. Depois da incubação, as placas foram lavadas quatro vezes e MAb foi adicionado em diluições em série de 1:250 a 64.000 no tampão diluente de C-ELISA (PBS com 0,3% de soro humano negativo de anticorpos de dengue e 0,1% Triton x100) e incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Após seis vezes lavando, 100µl de

IgG anti-camundongo de cabra conjugada com a peroxidase de rábano (HRP) adicionada a cada poço na diluição 1:3000 em tampão diluente e incubada em temperatura ambiente por outros 30 minutos. As diluições ótimas de IgG anti-camundongo de cabra com 1:3000 de HRP, foram determinadas por ELISA direto depois que as placas foram revestidas com diluições em série de MAb. Depois da incubação, as placas foram lavadas seis vezes e 100µl de OPD (otro-fenelino-diaimina, Sigma, EUA) foi adicionado a cada poço e incubado em temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Logo desenvolvimento de cor foi parado após 5 a 10 minutos adicionando 100µl 2M de H₂SO₄ e a densidade ótima foi lida em um comprimento de onda de 492 nanômetros.

1.5 ELISA competitivo (C-ELISA): C-ELISA depende do bloqueio da ligação de MAb a um epitopo comum de vírus da dengue na presença de soro de positivo de dengue. A competição é detectada como uma redução na leitura de densidade ótima obtida com o MAb sozinho. A quantidade de diminuição no sinal de ELISA seria proporcional ao título de IgG específico de vírus da dengue no soro. O teste foi realizado de três maneiras, a saber, adição simultânea de soro de teste e de MAb aos poços de captura de antígeno que conduzem a um ELISA competitivo ou adição de MAb após a pré-incubação de meia hora com soro de teste ou uma hora de pré-incubação com o soro seis vezes lavado seguido pela adição de MAb que foi chamado de ELISA de bloqueio ou B-ELISA. Todos os três formatos foram testados neste estudo.

Quatro sorotipos de dengue isolados em Singapura foram usados neste estudo. MAbs usados neste estudo foram selecionados usando mais de 100 isolados (Den-1, Den-2,

Den-3 e Den-4), isolados durante os últimos quatro anos (2002-2005) e reagidos encontrados igualmente com todos. A diluição ótima de antígenos de lisado foi determinada por titulação de tabuleiro usando a técnica de captura de antígeno em poços previamente capturados com IgA anti-dengue e a diluição 1:100 de antígeno de lisado foi ótima para o ensaio.

Placas de microtítulo de fundo chato de 96-poços maxi-sorb foram usadas para capturar antígeno usando o método descrito acima, lavadas quatro vezes e as placas estavam prontas para se usar para ensaios de C e B-ELISA. Para o ensaio 45 µl de tampão de bloqueio (PBS com 0,3% de soro humano negativo de anticorpos de dengue e 0,1% Triton x100) foi adicionado a cada poço e então 5 µl de soros de teste e de controle foram adicionados aos poços respectivos e são usados de acordo com o ensaio: para simultaneidade 50 µl de C-ELISA de MAb específico diluído 1:1000 em tampão de bloqueio foi adicionado aos poços contendo o soro; para a pré-incubação de C-ELISA, MAb específico foi adicionado após 30 minutos de soro de incubação em temperatura ambiente e para B-ELISA o soro foi incubado por uma hora em temperatura ambiente, lavado seis vezes e MAB específico foi adicionado a cada poço. Após incubação (60 minutos para simultaneidade e 30 minutos para a pré-incubação de C-ELISAs) as placas foram lavadas 6 vezes, e 100µl de uma diluição de 1:3000 de IgG anti-camundongo de cabra HRP-conjugado diluído em tampão de bloqueio foi adicionado a cada poço. O resto do ensaio foi feito exatamente como descrito para o ELISA indireto. No caso de B-ELISA, após a adição de placas de soros de teste foram incubadas no RT

por uma hora lavadas 6 vezes e então adicionado 100 µl de MAb a cada poço em diluições 1:1000. As etapas restantes foram similares ao C-ELISA.

1.6 Estabelecimento de MAbs e diluições de soro e formato de teste ótimos: Para o estabelecimento inicial de parâmetros de teste, dois soros positivos neutralizantes de vírus-2 de dengue (1:640 e 1:160), dois soros de dengue de convalescentes (confirmados por PCR), dois soros positivos neutralizante de febre amarela (1:1280 e 1:80) e dois soros negativos de flavivírus (VNT= 1:10) foram usados. Primeiramente, o MAbs foi titulado adicionando as diluições em série (1:250 a 1:64000) em tampão de bloqueio às placas de antígeno capturado e fazendo um ELISA indireto (Fig 1a e 2b). Então, duas diluições de MAbs foram arbitrariamente escolhidas, correspondendo a 100 e 75 a 80% do platô OD na curva de titulação e testadas por C-ELISA e B-ELISA contra as diluições em série de soros (Fig 2a, 2b e 3). Todas as amostras foram testadas em duplicata. Os controles incluíram poços sem o soro, mas MAbs (inibição de 0%) e poços sem soro e sem MAbs (inibição de 100%), os componentes faltantes sendo substituídos com o tampão de bloqueio.

1.7 Quantificação de resultados de C e de B-ELISA e análise estatística: A inibição de ligante de MAb ao epitopo específico na proteína de envelope em presença de soro foi expresso como a percentual de inibição (PI), calculada do valores de OD médio usando a seguinte fórmula:

$$PI = [100 - (\text{amostra teste de OD} / \text{MAb médio de OD}) \times 100]$$

A média e desvio padrão de valores de percentual de inibição das amostras de soro negativas e positivas de

dengue foi calculado e o limite positivo foi estabelecido. A especificidade e a sensibilidade relativas de C-ELISA foram estimadas usando o VNT como o teste padrão de ouro.

2. Resultados

5 **2.1 Diluições ótimas de antígeno e de MAb:** Já que uma das exigências de C-ELISA era a possibilidade de usar antígenos de lisado de dengue não purificado e não concentrado, a estratégia adotada era o uso de uma IgA de antidengue de captura que foi previamente capturada por IgA
10 antihumana para a placa de ELISA maxi-sorb. A técnica é capaz de imune-purificar e concentrar o antígeno viral de dengue do lisado de célula e apresentá-lo como o antígeno preso a uma IgG específica dengue (do soro positivo ou MAb específico). Nós observamos que purificação de antígeno
15 capturado de IgA específico antidengue seguida pela detecção usando MAb específico de dengue (complexo ou sorotipos específicos) pegou mais antígenos que ELISA capturado de MAb (Fig-1a e 1b).

2.2 Diluições ótimas de antígeno, MAb e soro: O
20 objetivo principal de C-ELISA era diferenciar anticorpo específico de dengue de outros membros da família flaviviridae. Conseqüentemente, a especificidade do teste foi medida por sua habilidade de discriminar entre o soro de vírus da dengue fraco-positivo (como definido por VNT) e
25 soro de flavivírus positivo forte (febre amarela) em várias concentrações. Nós expressamos a especificidade como a diferença média em valores de PI entre o soro de dengue fraco positivo e o soro de febre amarela positivo forte. A Figura-2a apresenta curvas de titulação dos MAb
30 específicos de pan-dengue (pan-dengue MAb- Abcam, UK e Pan-

dengue MAb- ICL, USA) e as diluições em que foram adicionalmente testados. A figura 2b expressou os diferenciais como uma função de diluições de soro. Com base no resultado na Fig. 2b, adotamos as diluições de saturação de 75 a 80% (1:1000) como a diluição ótima dos MABs na testagem subsequente. Na concentração de MABs, a diluição ótima de soro era a diluição rendendo o valor máximo. Esta diluição de soro foi de 1:10 (Fig-3). É notável que os dois platôs de MABs na mesma diluição com o soro (Fig-2a). Na testagem subsequente, observamos que deram resultados semelhantes no teste, e escolhemos usar Pan-dengue MAB, ICL, USA por causa de seu valor mais barato e disponível.

2.3 Formato de teste: ELISA competitivo contra B-ELISA e períodos de incubação: Nós comparamos ELISA competitivo e de bloqueio pelos soros de dengue forte, moderado, fraco e negativo (VNT = 1:640, 1:160, 1:40 e < 1:10). Esta comparação foi estendida avaliando os valores para combinações diferentes de períodos de soro e de incubação de MABs, com soros com diluição ótima. MABs ou soro foram adicionados simultaneamente ou MAB adicionado após a pré-incubação com o soro para períodos de incubação totais (soro mais MAB) de 45, 60, 90 e 120 minutos. A Figura-4 indica claramente que o formato de competitivo e de bloqueio rendeu sensibilidade e especificidade similares. Adicionalmente, uma pré-incubação de 30 minutos com o soro e incubação adicional de 30 minutos após ter adicionado o MAB resultou em especificidade e sensibilidade ótimas do que a adição simultânea de MAB e soro.

2.4 Valor limite negativo: Usando 100 amostras de soro negativas para os anticorpos de dengue (IgG e IgM), usando

ELISA de captura de IgM e IgG de dengue indireta (Pan-bio, Austrália e IVD Research Inc, Carlsbad, CA 92008, USA) e 64 soros positivos de dengue (VNT > 1:20) e 25 IgG de dengue reativo, mas negativo ao vírus da dengue VNT (<1:10), um valor de limite foram estabelecidos para C e B ELISA (Fig-5). Para as duas populações combinadas (Fig-5a, 5b), o valor limite foi ajustado arbitrariamente na média (9,9) mais 2 de desvio padrão ou inibição (6,6). Quando as amostras de soro reativas cruzadas de flavivírus são consideradas sozinhas (Fig-5, o mesmo ponto de limite é dado pela média mais 3 de desvio padrão. Para as amostras de soro negativas absolutas, a média mais desvios padrão deu um valor de limite de inibição de 25%.

2.5 Comparação do VNT e C-ELISA: A Figura-6 apresenta títulos de ponto final médios para os dois conjuntos de amostras de soro, como determinado pelo VNT e C-ELISA. Os coeficientes de correlação totais entre resultados do teste eram ($n = 64$). Combinando todas as amostras, a especificidade e a sensibilidade de C-ELISA relativo ao VNT foram estimadas como mostrado na Tabela 1.

A tabela 1 mostra a comparação de C-ELISA com teste de neutralização de vírus (VNT) para detectar o anticorpo específico de dengue (IgG).

Tabela 1: Teste de neutralização de vírus (VNT)

C-ELISA		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	62	0	62
	Negativo	2	100	102
	Total	64	100	164

Sensibilidade = $62/64 = 1 \times 100 = 96,88\%$, especificidade = $100/100 = 1 \times 100 = 100\%$, valor preditivo positivo = $62/62 \times 100$

=100 e valor preditivo negativo = $100/102 \times 100 = 98\%$.

2.6 C-ELISA e infecção secundária de dengue: A sensibilidade e a especificidade de C-ELISA para a detecção de infecção secundária de dengue foram comparadas com duas técnicas convencionais; razão de - antidengue IgM e IgG. $\leq 1,2$ (infecção secundária) e $\leq 1,2$ (infecção primária, Shu e outros, 2003) e ELISA de captura de IgG anti-dengue, que é equivalente a $\geq 1:2560$ unidade de HI (tabela 3).

A tabela 2 mostra a comparação de C-ELISA com técnicas convencionais (razão de IgM e IgG) de detectar a infecção secundária de dengue.

A tabela 3 mostra a comparação de C-ELISA com técnicas convencionais (ELISA de captura de IgG de dengue) de detecção de infecção secundária de dengue.

Tabela 2: razão de IgM/IgG de antidengue ($\leq 1:2$ e $\leq 1:2$)

C-ELISA		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	64	8	72
	Negativo	51	31	82
	Total	115	39	154

Sensibilidade = $72/115 \times 100 = 62,60\%$, especificidade = $31/39 \times 100 = 79,48\%$, valor preditivo positivo (PPV) = $64/72 \times 100 = 88,89\%$ e valor preditivo negativo = $31/82 \times 100 = 37,80\%$

Tabela 3: ELISA de captura de IgG de antidengue

C-ELISA		Positivo	Negativo	Total
	Positivo	54	18	72
	Negativo	16	66	82
	Total	70	84	154

Sensibilidade = $54/70 \times 100 = 77,14\%$, Especificidade =

$82/84 \times 100 = 97,62\%$, valor preditivo positivo = $54/72 \times 100 = 75\%$ e valor preditivo negativo = $66/82 \times 100 = 80,49\%$.

2.7. C-ELISA e sorotipagem de dengue: O teste foi usado também para diferenciar os sorotipos de presença de vírus da dengue em amostras de soro usando anticorpos monoclonais específicos de sorotipo de dengue; Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4. Oitenta e uma amostras de soro específicas de dengue previamente detectadas por anticorpos monoclonais de pan-dengue foram analisadas usando anticorpos monoclonais específicos de sorotipo de dengue. Três tipos Mabs específico de sorotipo de dengue; dengue-2, dengue-4 e dengue-1 foram usados. Os resultados na tabela 4 mostram que 80,25% foram positivos para Den-2, 49,38% dengue-4 e 32,10% ao vírus de dengue-1 respectivamente. vinte por cento dos soros foram positivos a todos os três sorotipos de dengue (Den-2, Den-4 e Den-1), 38,46% de amostras foram positivos para anticorpos de dengue 2 e dengue 4, 10,77% dos soros tiveram anticorpos contra dengue 2 e dengue-1 enquanto 12,50% de amostras de soro foram positivas para vírus de dengue-4 e dengue 1. As amostras de soro foram testadas contra o sorotipo 3 de dengue devido à baixa reatividade de MAb específico de sorotipos.

Tabela 4: Sorotipagem de dengue

Total de Amostras	Den-espec.	Den-1 espec.	Den-2 espec.	Den-4 espec.	Den-1+Den2+Den-4	Den-1 + Den-2	Den-1 +Den-4	Den-2 +Den-4
88	81	26	65	46	13	20	18	25
	90,05%	32,10%	80,25%	49,38%	20%	30,77%	27,69%	38,46%

2.8. Quinze minutos e ELISA competitivo em uma etapa:
O teste foi realizado como descrito na seção 2,3 exceto o

anticorpo monoclonal competitivo foi conjugado com HRP (ICL, USA) e adicionado simultaneamente com soro de teste. O período de incubação total foi encurtado de 90 minutos a 15 minutos e duas etapas em uma etapa. O resultado dos 15 minutos, ensaio de única etapa foi comparado com a pré-incubação de C-ELISA e 30 minutos simultâneo em uma etapa de C-ELISA e foi encontrado 100% similaridade (Tabela-5).

Tabela 5: Comparação de tempos de desempenho

	Total de amostras	C-ELISA/90 minutos e 2 etapas	C-ELISA/30 minutos e 1 etapa	C-ELISA/15 minutos e 1 etapa
Positivo (IgG Pan-bio)	98	80 (81,63%)	83 (84,69%)	81 (82,65%)
Negativo (IgG Pan-bio)	29	1 (3,45%)	3 (10,35%)	1 (3,45%)

2.9 ELISA competitivo contra o vírus de encefalite japonesa: C-ELISA baseado em monoclonal foi também estabelecido contra os Flavivírus de não-dengue como o vírus da encefalite japonesa (JEV) usando o anticorpo monoclonal específico de vírus (reatividade cruzada com vírus de encefalite St Louis). A placa foi preparada usando o protocolo descrito na seção 2.3 e o antígeno de JEV foi capturado ao invés do vírus da dengue. Em resumo, o antígeno do lisado de JE (cepa Nayakama) foi usado e capturado pela IgA de antidengue. O anticorpo anti-JE foi produzido em coelho e usado para o desenvolvimento do ensaio e 83 amostras de soro humanas foram selecionados usando a técnica. De 83 amostras, 65 amostras foram

positivas para IgG de reatividade cruzada de flavivírus e os 28 soros restantes negativos para flavivírus. Os resultados mostraram que 89,23% (58/65) de soro reativo de flavivírus foi positivo pelo JE C-ELISA enquanto 89,29% (25/28) da amostra negativa de flavivírus não reagiu com JE-C-ELISA. Entretanto, a validação da técnica não foi feita usando amostras de soro confirmadas de JE.

3. Discussão

O ELISA competitivo MAb-baseado provou ser um método rápido, sensível e específico para a detecção de anticorpo de dengue. O teste oferece a vantagem adicional, sobre ELISA indireto, de permitir a seleção de soros dos membros diferentes de flavivírus. Comparado a VNT, C-ELISA oferece altos níveis de sensibilidade (100%) e de especificidade (100%) enquanto diminuir o tempo de aplicação de 7 dias para menos de 2 horas. Adicionalmente, ao contrário do VNT, C-ELISA pode ser menos afetado pela qualidade dos soros (citotoxicidade, infecção, hemolizado ou ricos em gordura) e baixo nível de reatividade cruzada contra outros membros de flavivírus. As contaminações podem afetar o resultado da sorologia em duas maneiras: degradação de anticorpo e alteração de pH a um nível que impeça a ligação de anticorpo. Na prática, a diluição relativamente elevada em que o soro é selecionado (1:20 ou acima) deve anular o segundo fator.

A superioridade de B-ELISA e C-ELISA de soro de pré-incubação por 30 minutos sobre a adição simultânea de soro de teste e MAb pode ser devido ao fato que MAb é altamente purificado e tem uma maior afinidade para o epítipo do que os anticorpos de soro tem. Quando os dois são adicionados

simultaneamente, apenas o anticorpo de soro de alta afinidade competiria em um formato competitivo, soros de primária resposta inicial, que conteriam principalmente o anticorpo de baixa afinidade, testaram negativo enquanto os
5 soros de resposta secundária, presumivelmente tendo a afinidade elevada, mostraram um nível de sensibilidade comparável ao de B-ELISA. Entretanto o uso de anticorpo monoclonal conjugado específico para o vírus da dengue eliminou a sensibilidade mais baixa da técnica e resultados
10 similares foram obtidos. A técnica modificada não somente melhorou a sensibilidade do teste, mas também reduziu o tempo total de 90 minutos para 15 minutos e duas etapas para uma etapa. Os 15 minutos, uma etapa de C-ELISA faz uma descoberta tremenda da técnica atual de detecção de IgG de
15 dengue e um único teste pode ser usado para diferenciar entre a infecção primária e secundária de dengue na fase inicial de doença assim como a soro-vigilância específica de dengue que é particularmente importante onde há mais de um flavivírus co-circulante. Atualmente dois tipos de teste
20 de IgG de antidengue são usados para a detecção de infecção secundária de dengue e soro-vigilância.

A aproximação de padronização do C-ELISA a um ensaio de micro-neutralização para duas razões: (i) o VNT é presentemente o único teste confirmativo disponível de
25 infecção de dengue onde mais de um flavivírus está presente e (ii) os anticorpos de neutralização são considerados o melhor previsor de status imune hospedeiro. Os resultados de C-ELISA concordam muito com os do VNT e havia um coeficiente de correlação positivo muito elevado ($r=0,88$)
30 entre dois resultados de análise.

A detecção de anticorpo específico de dengue é, não somente importante para o estudo epidemiológico, mas também para diagnosticar a infecção secundária através da detecção de IgG específica de dengue que o paciente pode levar da infecção precedente. De acordo com o WHO, somente o soro que tem nível de HAI > 2560 de IgG de antidengue na fase inicial de convalescência de infecção de dengue é considerado como a infecção secundária (WHO Manual-1982). Entretanto, este critério de detecção de infecção secundária de dengue pode conduzir o paciente a submeter-se a forma severa de infecção de dengue como a febre hemorrágica de dengue (DHF) por causa do procedimento de detecção lento e assim não aplicável para gerência de paciente apropriada. Comparamos nossa nova técnica com um teste equivalente da WHO (ELISA de captura de IgG de dengue, tabela 3) e descobrimos que o C-ELISA é 77% sensível e 97,62% específico para ELISA captura de IgG de dengue e foi também observado que 18 casos de dengue apesar da presença de IgG específica de dengue, a captura de IgG não detectou, enquanto 16 casos de dengue foram detectados pelo ELISA de captura de IgG que não eram específicos para IgG de dengue. Conseqüentemente, a presença de IgG de reatividade cruzada de dengue de nível elevado não significa a infecção secundária de dengue, que é um cenário comum, onde mais de um flavivírus está co-circulando. Por outro lado, a presença de baixo nível de IgG específica de dengue em uma fase inicial da doença de dengue não descarta casos secundários de dengue. Uma outra técnica descrita por Shu e col., 2003 usando razões de IgM e IgG (tabela 2) mostraram que 74,67% de pacientes de dengue tiveram uma

infecção secundária, que é consideravelmente elevado comparado à captura de IgG de dengue e C-ELISA. Sob esta circunstância, descobrimos a que nossa técnica inventiva de C-ELISA é uma ferramenta poderosa para detectar infecção
 5 secundária pela detecção de IgG específica de dengue (ambos níveis baixos e altos) mesmo dentro de 15 minutos essa presença no soro do paciente durante a doença aguda de dengue.

O protocolo desenvolvido para C-ELISA foi demonstrado
 10 usando o antígeno de lisado de dengue e o anticorpo monoclonal específico de dengue. Isto pode também ser usado contra outros Flavivírus e resultados preliminares na encefalite japonesa é um exemplo disto.

Finalmente deve ser compreendido que as várias outras
 15 modificações e/ou alterações podem ser feitas sem sair do conceito inventivo da presente invenção como esboçado aqui.

REFERÊNCIAS

Gubler, DJ., Sather, G.E. (1988). *Laboratory diagnosis of dengue and dengue hemorrhagic fever..* In A. Homma, and
 20 J. F. Cunha (ed.), *Proceedings of the International Symposium on Yellow Fever and Dengue*, p. 291-322.

Gubler, D. J. 1996. *Serologic diagnosis of dengue/dengue haemorrhagic fever.* Dengue Bull. 20:20-23.

Gubler, DJ. (1998). *Dengue and dengue hemorrhagic fever.*
 25 Clin Microbiol Rev. 11(3):480-96.

Gubler, DJ. (2002). *Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century.* Trends Microbiol. 10(2):100-3. Innis, B. L₁ A. Nisalak, S. Nimmannitya, S. Kusalerdchariya, V.
 30 Chongswasdi, S. Suntayakorn, P. Puttisri, and C. H. Hoke.

1989. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:418-427.

Shu, P. Y., L. K. Chen, S. F. Chang, Y. Y. Yuen, L. Chow, L. J. Chien, C. Chin, T. H. Lin, and J. H. Huang. 2003. Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10:622-630.

World Health Organization. 1997. *Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control*, 2nd ed. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

WHO: Fact sheet No: 117. (2002). Dengue and Dengue Haemorrhagic fever. <http://www.who.int/inf-fs/en/fact117MmI>

Ooi, E.E., Hart, T.J., Tan, H.C., Chan, S.H. (2001). Dengue seroepidemiology in Singapore. *Lancet.* 357(9257):685-6.

Simmons, M., Jennings, G., Oprandy, J.J. (1993). A rapid membrane based immunobinding assay for the detection of dengue virus in tissue culture. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 24(4):742-6.

Wu, S.J., Paxton, H., Hanson, B., Kung, C.G., Chen, T.B., Rossi, C, Vaughn, D.W., Murphy, G.S., Hayes, CG. (2000). Comparison of two rapid diagnostic assays for detection of immunoglobulin M antibodies to dengue virus. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7(1): 106-10.

Stollar, V., Stevens, T.M., Schlesinger, R. W. (1966). Studies on the nature of dengue viruses. II.

Characterization of viral RNA and effects of inhibitors of RNA synthesis. *Virology*. 30(2):303-12. Newton, E.A., Reiter, P. (1992). A model of the transmission of dengue fever with an evaluation of the impact of ultra-low volume (ULV) insecticide applications on dengue epidemics. *Am J Trop Med Hyg*. 47(6):709-20.

Platt, K.B., Linthicum, K.J., Myint, K.S., innis, B. L., Lerdthusnee, K., Vaughn, D. W. (1997). Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 57(2): 119-25.

Scott, T.W., Naksathit, A., Day, J.F., Kittayapong, P., Edman, J.D. (1997). A fitness advantage for *Aedes aegypti* and the viruses it transmits when females feed only on human blood. *Am J Trop Med Hyg*. 57(2):235-9.

Nawa, M., Takasaki, T., Yamada, K.I., Akatsuka, T., Kurane, I. (2001). Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. *J Virol Methods*. 92(1):65- 70.

Groen ,J., Koraka, P., Velzing, J., Copra, C, Osterhaus, A.D. (2000). Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *CHn Diagn Lab Immunol*. 7(6):867-71.

Halstead, S.B. (1974). Etiologies of the experimental dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg*. 23(5):974-82.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a detecção de exposição de um indivíduo a um flavivírus caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

5 contatar uma amostra biológica do indivíduo com uma mistura de componentes capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus;

 submeter a amostra biológica e os componentes capturados de IgA de antinflavivírus para um anticorpo
10 competitivo monoclonal específico de flavivírus; e

 determinar a presença de um complexo que forma entre um parceiro de ligação específico de IgG flavivírus presente na amostra biológica e o componente capturado de IgA de antinflavivírus de flavivírus na presença do
15 anticorpo competitivo monoclonal específico de flavivírus.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a amostra biológica e os componentes capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus serem pré-incubados para formar um complexo
20 antes de submeter ao corpo competitivo monoclonal específico de flavivírus.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a amostra biológica, o componente capturado de IgA de antinflavivírus de flavivírus
25 e o anticorpo competitivo monoclonal específico de flavivírus serem contatadas simultaneamente antes de determinar a presença de um complexo.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o agente competitivo imunológico
30 específico de flavivírus é um anticorpo específico para um

epitopo de um componente capturado de IgA de antinflavivírus de flavivírus.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o anticorpo competitivo
5 monoclonal específico de flavivírus ser conjugado a um grupo reportador.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de os componentes capturados de IgA de antinflavivírus serem capturados de um lisado de células
10 infectadas com flavivírus.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o componente capturado de IgA de antinflavivírus de flavivírus ser selecionado do grupo incluindo proteínas estruturais e não estruturais de
15 flavivírus, partícula de flavivírus e fragmentos do mesmo, glicoproteínas, lipídeos e carboidratos derivados do flavivírus.

8. Método, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de a proteína estrutural ser
20 selecionada do grupo incluindo proteínas de envelope, proteínas de membrana Pr, e proteínas de nucleocapsídeo.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de o componente capturado de IgA de antinflavivírus ser um anticorpo anti-idiotípico a um sítio
25 de ligação de antígeno de um anticorpo de flavivírus gerado em resposta a exposição a um componente capturado de IgA derivado de um flavivírus ou equivalente do mesmo.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o parceiro de ligação ser um
30 anticorpo expresso em um estágio inicial de uma infecção de

flavivírus, durante a convalescência ou derivado de um infecção precedente.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 7, caracterizado pelo fato de o flavivírus ser selecionado de um grupo incluindo vírus da febre amarela, vírus da dengue, e vírus de JE.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de o método detectar a exposição ao sorotipo de vírus da dengue selecionado do grupo incluindo DEN-1, DEN-2, DEN-3 ou DEN-4.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de o agente competitivo imunológico específico de dengue ser um anticorpo específico a um epitopo comum para os sorotipos de vírus da dengue DEN-1, DEN-2, DEN-3 ou DEN-4.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de a proteína não estrutural ser selecionado de um grupo incluindo NS-1, NS-2a, NS-2b, NS-3, NS-4a, NS-4b e NS-5.

15. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de o anticorpo de parceiro de ligação ser um anticorpo de IgG que é específico a um sorotipo de dengue selecionado do grupo incluindo DEN-1, DEN-2, DEN-3 ou DEN-4.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a amostra biológica ser selecionada do grupo incluindo sangue, saliva, fluido da espinha, células B, células T, plasma, soro, urina e fluido amniótico.

17. Mistura de componentes capturados de IgA de

antiflavivírus de flavivírus caracterizada pelo fato de ser para o uso em um método das reivindicações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou 16.

18. Mistura de componentes capturados de IgA de
5 antiflavivírus, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de ser capturado de um lisado de células infectadas com o flavivírus.

19. Mistura, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de compreender componentes
10 selecionados do grupo incluindo proteínas estruturais e não estruturais de flavivírus, partículas de flavivírus e fragmentos do mesmo, glicoproteínas, lipídeos e carboidratos derivados do flavivírus.

20. Mistura, de acordo com a reivindicação 19,
15 caracterizada pelo fato de a proteína estrutural ser selecionada do grupo incluindo proteínas de envelope, proteínas de membrana Pr, e proteínas de nucleocapsídeo.

21. Mistura, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de o flavivírus ser selecionado do
20 grupo incluindo vírus da febre amarela, vírus da dengue, e vírus da JE.

22. Mistura, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de o vírus da dengue ser selecionado do grupo incluindo DEN-1, DEN-2, DEN-3 ou DEN-
25 4.

23. Mistura, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de a proteína não estrutural ser selecionada de um grupo incluindo NS-1, NS-2a, NS-2b, NS-3, NS-4a, NS-4b E NS-5.

30 24. kit para detecção de exposição de um indivíduo a

um flavivírus, o referido kit caracterizado pelo fato de compreender:

componentes capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus;

5 um anticorpo competitivo monoclonal específico de flavivírus; e

pelo menos um agente de detecção para detectar um complexo que se forma entre um parceiro de ligação específico de IgG presente em uma amostra biológica e um
10 componente capturado de IgA de antinflavivírus na presença do anticorpo competitivo monoclonal específico de flavivírus.

25. Kit, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de o componente capturado de IgA de
15 antinflavivírus ou anticorpo competitivo monoclonal específico de flavivírus ser imobilizado em um suporte sólido.

26. Kit, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de o componente capturado de IgA de
20 antinflavivírus ser selecionado do grupo incluindo incluindo proteínas estruturais e não estruturais de flavivírus, partículas de flavivírus e fragmentos do mesmo, glicoproteínas, lipídeos e carboidratos derivados do flavivírus.

25 27. Kit, de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de a proteína estrutural ser selecionada do grupo incluindo proteínas de envelope, proteínas de membrana Pr, e proteínas de nucleocapsídeo.

28. Kit, de acordo com a reivindicação 24,
30 caracterizado pelo fato de o flavivírus ser selecionado do

grupo incluindo vírus da febre amarela, vírus da dengue, e vírus da JE.

29. Kit, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de o anticorpo monoclonal
5 competitivo específico de dengue ser um anticorpo específico de dengue específico para um epitopo comum aos sorotipos de vírus da dengue DEN-1, DEN-2, DEN-3 ou DEN-4.

30. Kit, de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de a proteína não estrutural ser
10 selecionada de um grupo incluindo NS-1, NS-2a, NS-2b, NS-3, NS-4a, NS-4b E NS-5.

31. Suporte sólido para o uso em um método para a detecção de exposição de um indivíduo a um flavivírus, o referido método caracterizado por compreender:

15 contatar uma amostra biológica do indivíduo com uma mistura de componentes capturados de IgA de antinflavivírus de flavivírus;

 submeter a amostra biológica e os componentes capturados de IgA de antinflavivírus a um anticorpo
20 competitivo monoclonal específico de flavivírus;

 determinar a presença de um complexo que forma entre um parceiro de ligação específico de IgG flavivírus presente na amostra biológica e o componente capturado de IgA de antinflavivírus na presença do anticorpo competitivo
25 monoclonal específico de flavivírus;

 o referido suporte caracterizado pelo fato de compreender componentes capturados de IgA de antinflavivírus imobilizados no suporte.

32. Suporte sólido, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de ser selecionado do grupo
30

incluindo uma conta, um disco, uma partícula magnética, ou um sensor de fibra ótica, uma placa de microtítulo, placa de vidro, ou microchip biológico ou uma membrana incluindo membranas de nitrocelulose, filtros de membrana de
5 politetrafluoretileno, filtros de membrana de acetato de celulose e filtros de membrana de nitrato de celulose com carregadores de papel de filtro.

33. Método de avaliação do risco relativo de um ou mais indivíduos sendo expostos a flavivírus dentro de uma
10 localização definida caracterizado pelo fato de compreender:

a) obtenção de amostrar de uma população representativa dentro de uma localização definida; e

b) avaliação de exposição de membros individuais de
15 uma amostra de população a um flavivírus pelo método, compreendendo as etapas de:

i) contatar a amostra biológica de um indivíduo com um componente capturado de IgA de antinflavivírus derivado do flavivírus para formar um complexo entre o componente e um
20 parceiro de ligação específico de flavivírus na amostra biológica;

ii) determinação da presença do complexo que forma entre um parceiro de ligação específico de flavivírus presente na amostra biológica e um componente capturado de
25 IgA de antinflavivírus na presença de um agente competitivo imunológico específico de flavivírus, em que a presença do complexo seja indicativo de exposição do indivíduo a um flavivírus; e

c) avaliação de risco relativo de exposição dentro da
30 localização definida.

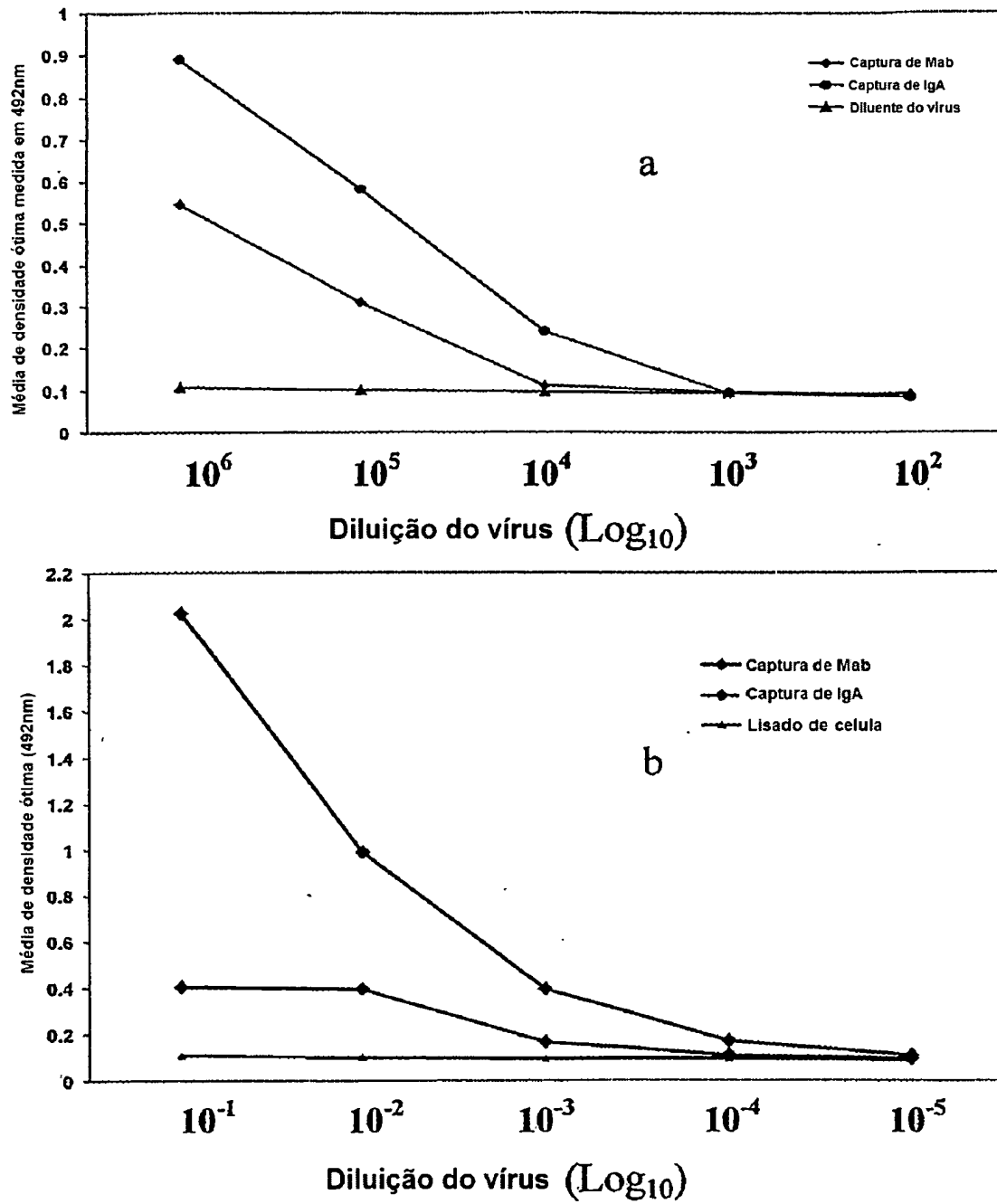


FIGURA 1 (A)

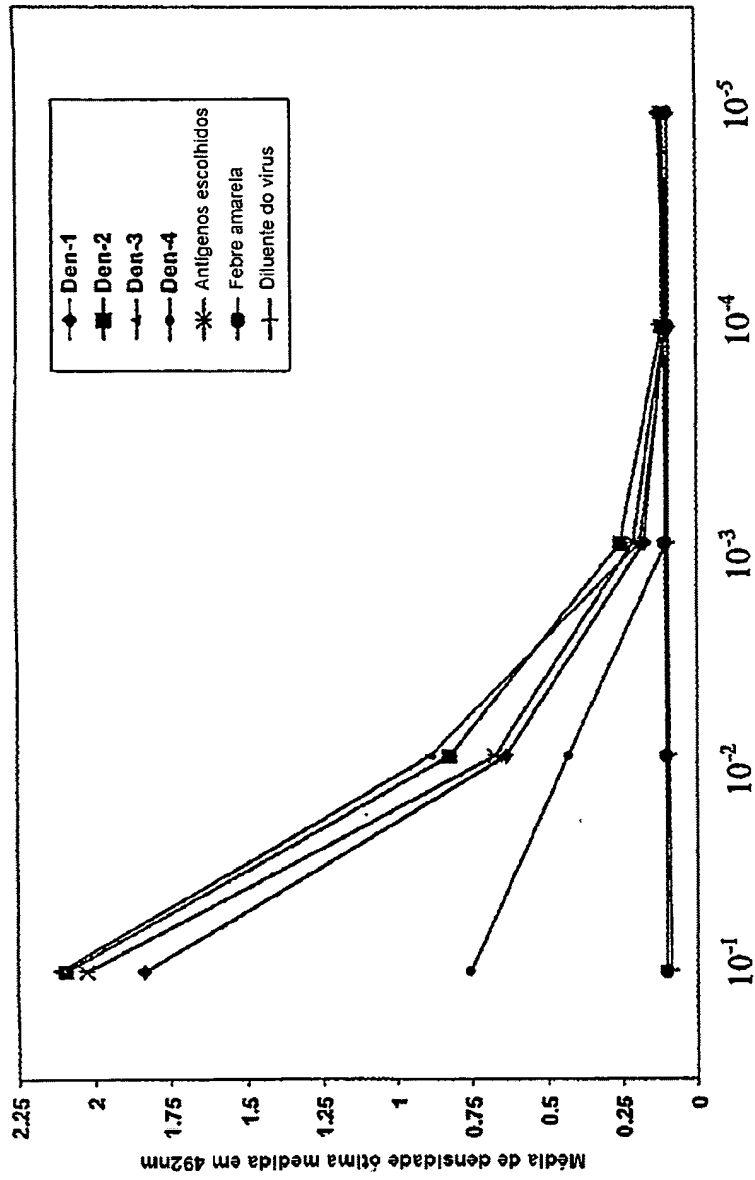


FIGURA 1 (B)

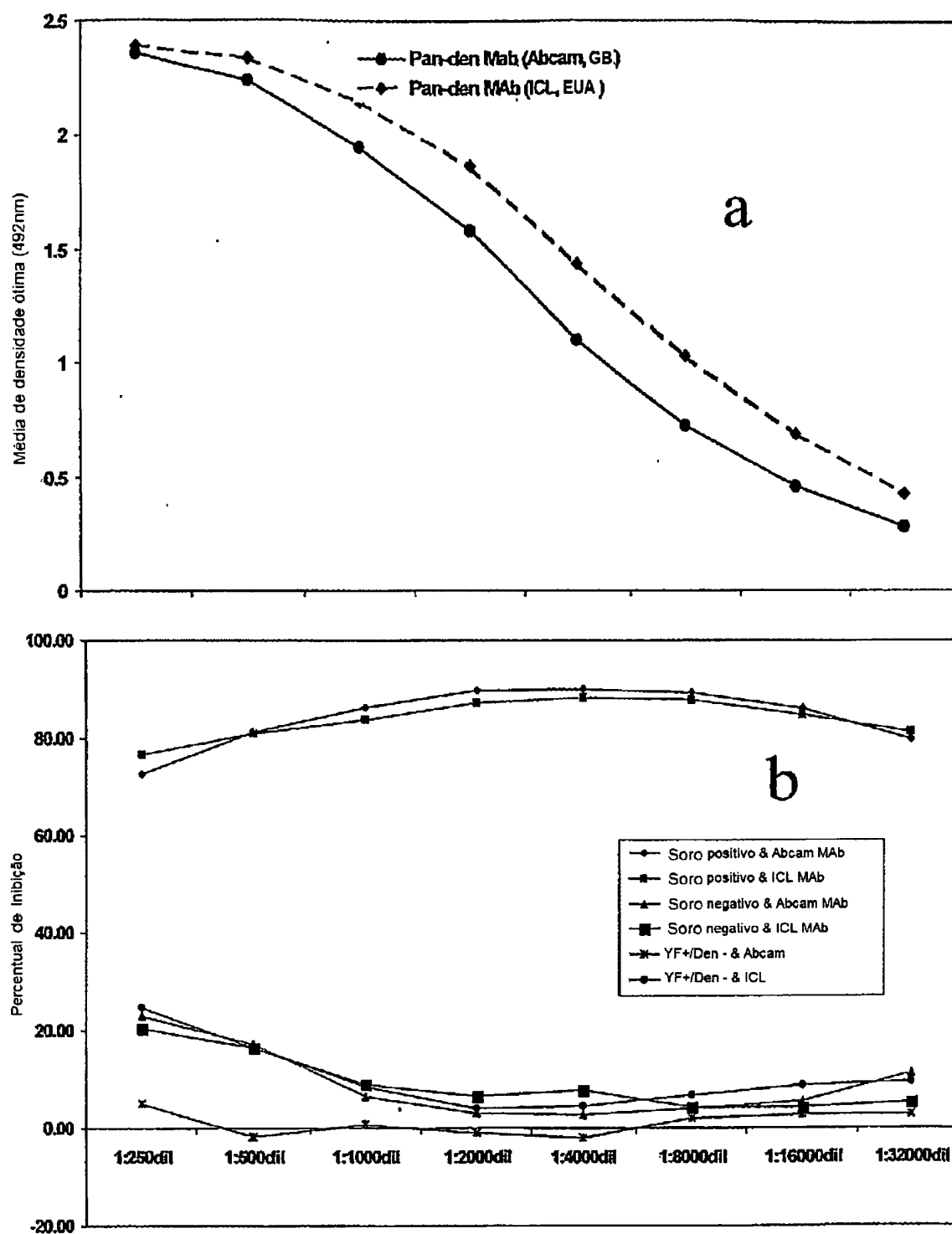


FIGURA 2

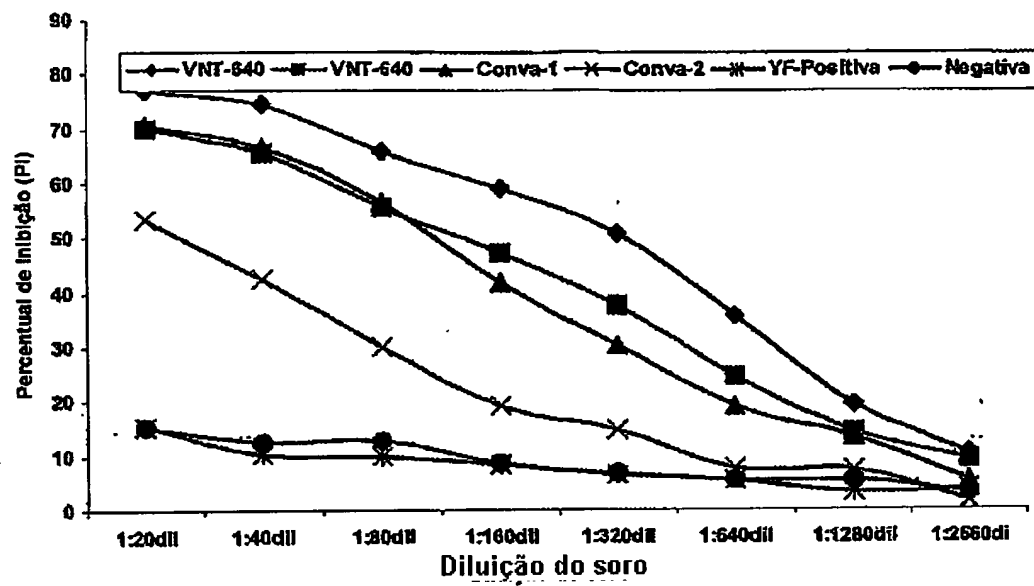


FIGURA 3

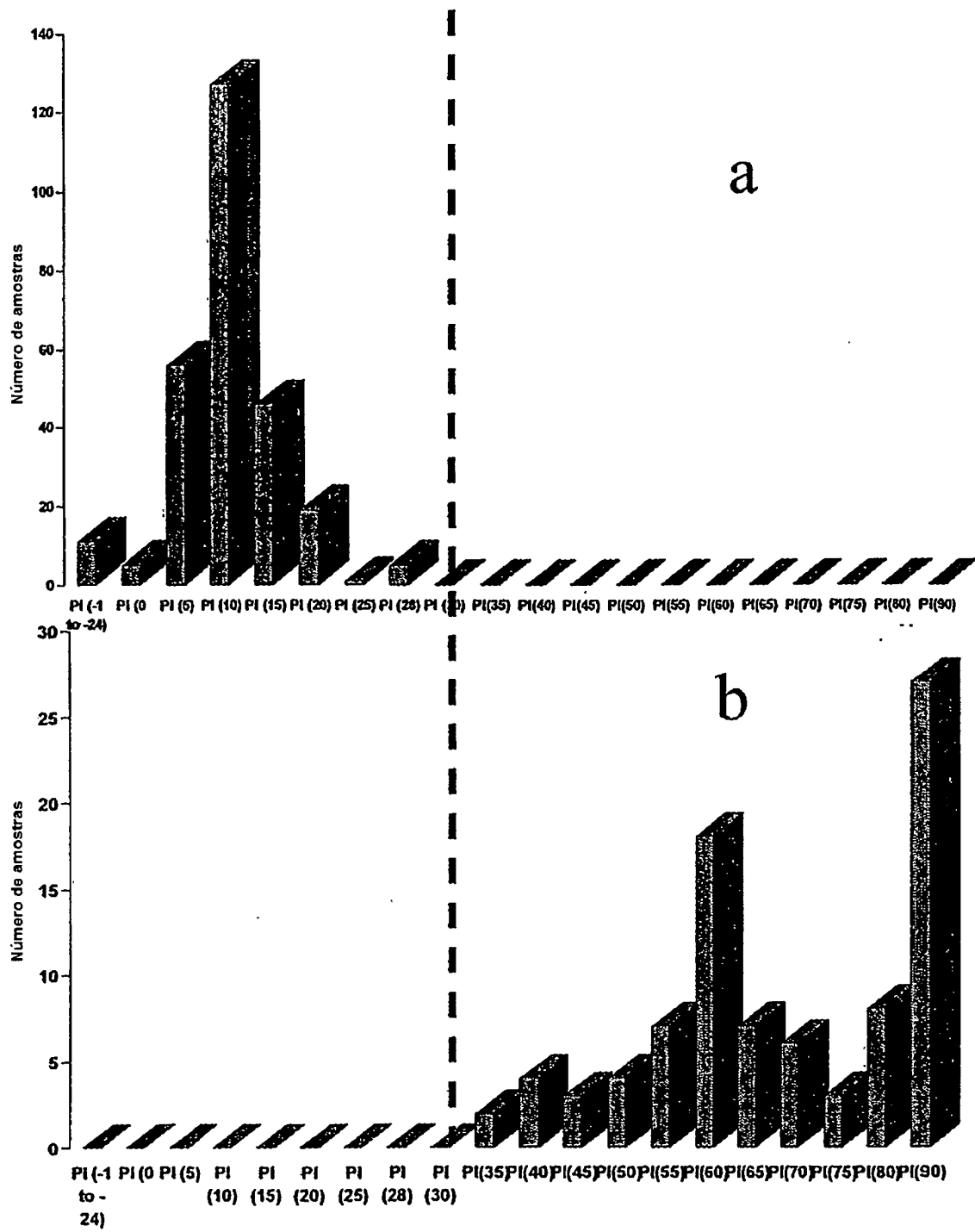


FIGURA 4

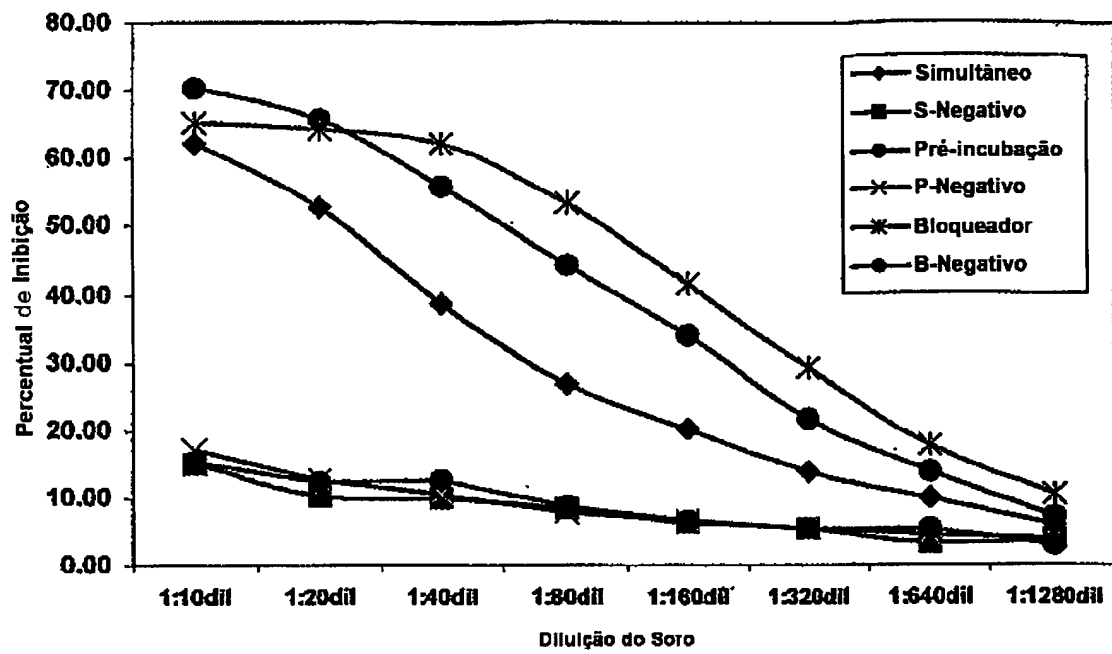


FIGURA 5

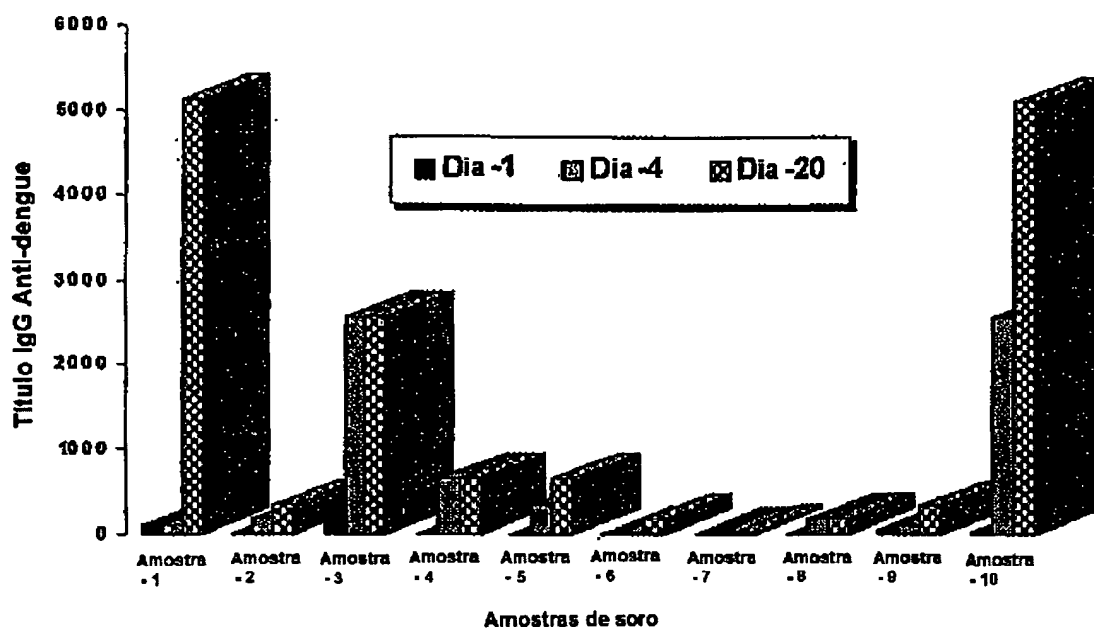


FIGURA 6

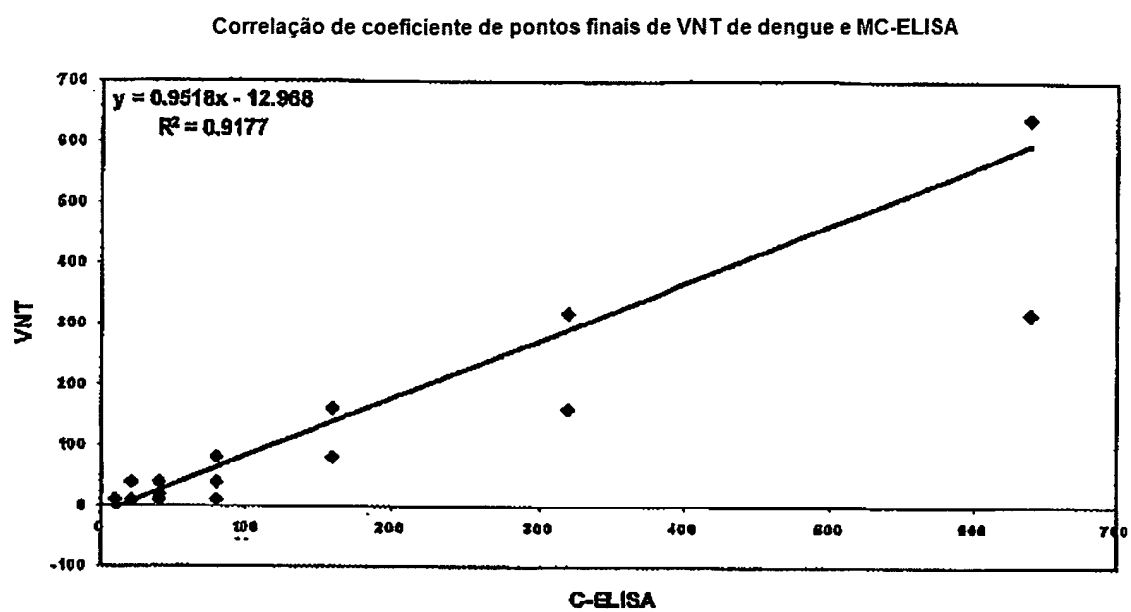


FIGURA 7

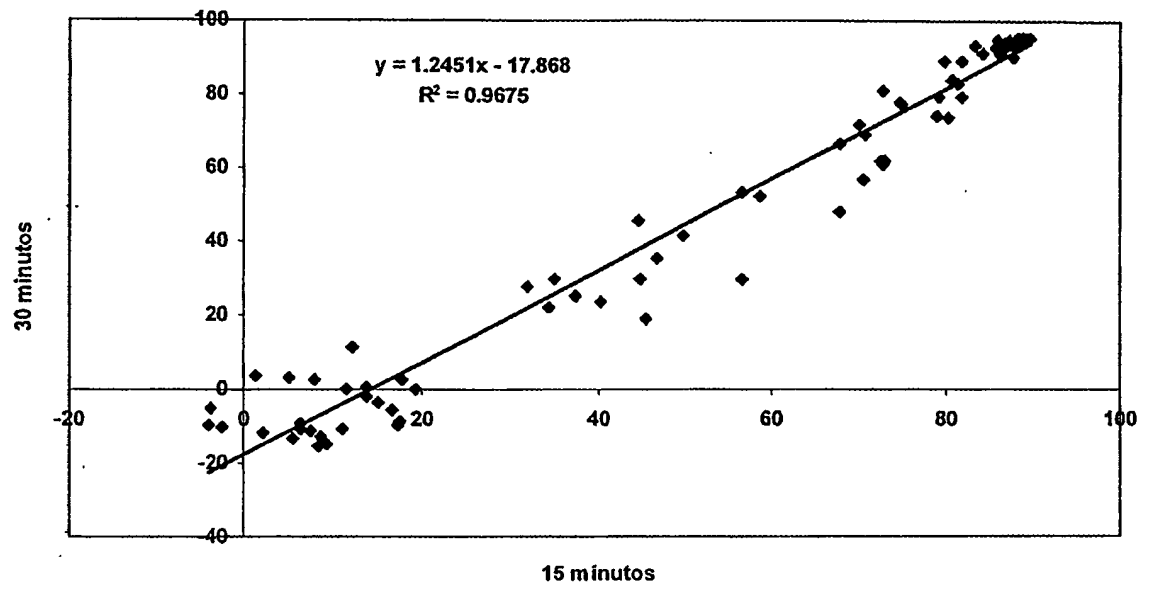


FIGURA 8

**ENSAIO IMUNOABSORVENTE LIGADO A ENZIMA COMPETITIVA (C-
ELISA) PARA A DETECÇÃO DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO DE
FLAVIVÍRUS**

Um ensaio imunoabsorvente ligado a enzima competitiva
5 (C-ELISA), usando agentes imunológicos específicos de
membro de flavivírus foi desenvolvido para detectar o
anticorpo específico aos membros dos flavivírus indicativos
de exposição ao flavivírus. O teste é baseado em uma
competição para o epítipo de ligação na proteína de
10 envelope do antígeno de flavivírus capturado usando IgA de
antiflavivírus na presença de soro positivo de flavivírus.
Este teste tem a sensibilidade, especificidade e velocidade
comparáveis ao ensaio de neutralização de vírus (VNT). C-
ELISA é uma técnica versátil, que poderia ter várias
15 aplicações. Ligeiras modificações deste protocolo poderiam
conduzir a um método de detecção baseado em ELISA de
infecção secundária ou um que poderia ser usado para
estudos soro-epidemiológicos específicos de sorotipo e/ou
avaliação de vacinas. O protocolo desenvolvido para C-ELISA
20 foi demonstrado usando o antígeno de lisado de dengue e o
anticorpo monoclonal específico de dengue. Isto pode ser
usado contra outros flavivírus e os resultados para a
encefalite japonesa ilustram isto.