

## TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO DE FLUXO LATERAL: UMA FERRAMENTA RÁPIDA DE DIAGNÓSTICO

Greice Japolla<sup>1</sup>, Greyciele Rodrigues Almeida<sup>1</sup>, Jair Pereira da Cunha Junior<sup>2</sup>, Luiz Artur Mendes Bataus<sup>3</sup>, Guilherme Rocha Lino de Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda, Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

<sup>2</sup>Doutor, Docente, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Brasil.

<sup>3</sup>Doutor, Docente, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Brasil.

E-mail de contato: greicejapolla@hotmail.com

Recebido em: 08/09/2015 – Aprovado em: 14/11/2015 – Publicado em: 01/12/2015  
DOI: [http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia\\_Biosfera\\_2015\\_232](http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_232)

### RESUMO

O teste imunocromatográfico de fluxo lateral, também chamado de teste rápido, tem sido uma ferramenta cada vez mais utilizada para o diagnóstico de uma vasta gama de alvos biológicos. Devido as suas características, esta plataforma é facilmente adaptada para uso em domicílio ou no campo, não necessitando de grandes recursos tecnológicos ou conhecimento técnico prévio, permitindo o monitoramento qualitativo, e ainda em alguns casos, quantitativo das amostras. Existem diferentes tipos de testes disponíveis comercialmente e a escolha do melhor formato está relacionada aos objetivos pretendidos, ou seja, o tipo de material a ser identificado, tais como antígenos, anticorpos ou qualquer outro material biológico ou químico. Diante disso, este trabalho teve como objetivo uma revisão ampla dos diferentes componentes dos testes imunocromatográficos, vantagens e desvantagens, sua aplicabilidade e avanços para o diagnóstico de doenças de interesse veterinário e humano, além da detecção de resíduos e contaminantes de produtos de origem animal.

**PALAVRAS-CHAVE:** Anticorpos, imunocromatografia, imunoconjugados, testes rápidos.

### LATERAL FLOW IMMUNOASSAY: A PLATFORM FOR POINT-OF-CARE DIAGNOSTIC

#### ABSTRACT

The lateral flow immunoassay, also called rapid test, has been a tool used for the diagnosis of a wide range of biological targets. Due to its characteristics, this platform is easily adapted to use in many different fields and does not require major technological resources or prior technical knowledge, allowing the qualitative and, in some cases, quantitative tracking of samples. There are different types of commercially available testing. The choice of the test format is related to the intended purpose, such as the diagnosis of antigens or antibodies, or other chemistry and

biological samples. Therefore, this work aims at a comprehensive review of the different components of immunochromatographic tests, their advantages and disadvantages, applicability to the diagnosis of veterinary and human-interest diseases, and the detection of residues and contaminants in animal products.

**KEYWORDS:** Antibodies, immunochromatography, immunoconjugate, rapid tests.

## INTRODUÇÃO

Testes diagnósticos devem ser capazes de detectar enfermidades de forma segura, rápida e eficaz. Para isto, várias técnicas de diagnóstico vêm sendo utilizadas, incluindo, entre outras, isolamento e identificação do patógeno, técnicas sorológicas como soroneutralização e ensaio imunoenzimático (ELISA), técnicas moleculares como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e testes imunocromatográficos de fluxo lateral (FLORES, 2007; NGOM et al., 2010).

O desenvolvimento de testes imunocromatográficos de fluxo lateral é o resultado de convergência de vários tópicos que podem ser rastreados desde a década de 1950 com bases na técnica de aglutinação em látex (PLOTZ & SINGER, 1956), porém continuou a ser estudado no início de 1980, onde foram firmemente estabelecidos durante os últimos anos dessa década. Desde então, a tecnologia, suas aplicações e a indústria continuaram a evoluir registrando mais de 500 patentes (O'FARRELL, 2009).

Existem vários formatos de testes imunocromatográficos. Frequentemente, os mais utilizados são: imunocromatografia de fluxo lateral, imunocromatografia de dupla migração (ou de duplo percurso – DPP), dispositivos de imunoconcentração e fase sólida. O teste imunocromatográfico de fluxo lateral será o foco desta revisão bibliográfica. Por ser um teste de rápida execução, gerando resultados em até 30 minutos, são chamados de testes rápidos de fluxo lateral ou apenas testes rápidos (WERSOM et al., 2013).

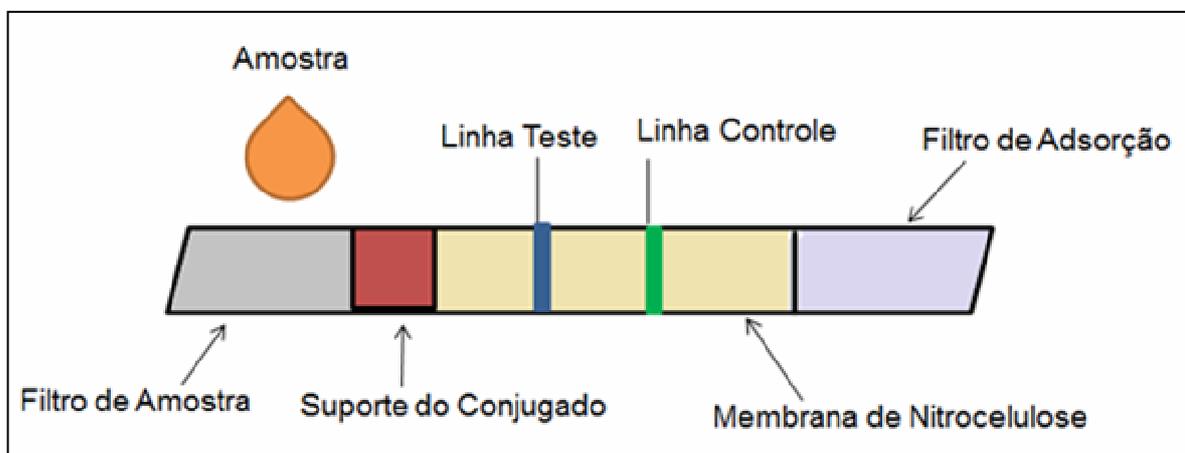
A fabricação de um teste imunocromatográfico é um processo que emprega princípios de biologia, química, física e engenharia. A maioria dos métodos em desenvolvimento é capaz de detectar anticorpos ou antígenos. As vantagens da utilização dos testes rápidos como ferramenta de diagnóstico são bem conhecidas: Rapidez no resultado, custo de fabricação relativamente baixo, facilidade de produção em alta escala, vida de prateleira longa, independência do uso de equipamentos para leitura e utilização de pequenos volumes de amostras. Porém, a tecnologia da produção normalmente exige longos ciclos de desenvolvimento, limitações de desempenho relacionado à sensibilidade e reprodutibilidade, seleção cuidadosa do mercado e infraestrutura. Apesar destas limitações, os testes imunocromatográficos de fluxo lateral tem alcançado grande penetração em uma variedade de segmentos como agricultura, aquicultura, saúde animal, segurança alimentar, área forense e diagnóstico médico (O'FARRELL, 2009; MILLIPORE, 2013).

Diante do crescente interesse por alternativas rápidas de diagnóstico, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica sobre testes imunocromatográficos de fluxo lateral, fornecendo informações sobre os componentes, princípios, os formatos existentes e suas aplicações.

## COMPONENTES DO TESTE

Os testes imunocromatográficos são compostos pelo filtro de amostra, suporte do conjugado, membrana de nitrocelulose e filtro de adsorção (Figura 1). As

partes se sobrepõem uma sobre a outra e são montadas sobre uma placa de suporte (O'FARRELL, 2009; MILLIPORE, 2013; SHAN et al., 2015).



**FIGURA 1:** Componentes do teste imunocromatográfico de fluxo lateral.

### **Filtro de amostra**

O filtro da amostra promove a distribuição uniforme e controlada do material a ser analisado para o suporte do conjugado, impedindo o alagamento do dispositivo. Existem vários materiais que podem ser utilizados: malhas de algodão, fibras de celulose e fibras de vidro (O'FARRELL, 2009; MILLIPORE, 2013).

As malhas de algodão normalmente funcionam muito bem para distribuir o volume de amostra uniformemente sobre o suporte do conjugado, porém são mais caras em relação a outros meios porosos e difíceis de processar através de máquinas de corte. Já as fibras de celulose têm menor custo e apresentam uma capacidade de receber volumes maiores de amostra sem prejudicar a uniformidade da dispersão. Apesar de serem de difícil manuseio, são os filtros mais frequentemente utilizados para produção de testes rápidos.

A escolha do filtro de amostra leva em consideração parâmetros que influenciam na taxa de liberação da amostra, principalmente a espessura e gramatura do filtro e pressão exercida dentro do cassete. A espessura pode ser dada como microns, milímetros ou milésimos de polegada e esta variabilidade pode ser crítica. Se o material da fibra for muito grosso, a absorção de líquido pode ser reduzida, já o material muito fino, pode inundar o interior, alterando significativamente as dinâmicas de fluxo da tira de teste (POSTHUMA-TRUMPIE et al., 2009; MILLIPORE, 2013).

### **Suporte do conjugado**

O conjugado é o resultado da conjugação de anticorpos ou antígenos com nanopartículas de ouro coloidal ou outras moléculas. Este deve ser fixado no suporte do conjugado, que tem como função transferir uniformemente a amostra sobre a membrana do teste (O'FARRELL, 2009; MILLIPORE, 2013).

Os materiais usados para o suporte são: fibras de vidro, poliéster e rayons (SAJID et al., 2014). A adição de conjugados em alguns desses materiais é um passo crítico para o desempenho final do teste. Dois métodos são tipicamente usados; o primeiro é a imersão do suporte de conjugado, o segundo é com o uso de

seringas que possibilitam dispensar com precisão por “spray” uma quantidade de microlitros por milímetro quadrado de material (O'FARRELL, 2009).

### **Membrana de nitrocelulose**

A membrana de nitrocelulose é posicionada na área conhecida como região analítica, devendo conter reagentes de captura na linha teste e linha controle. Esta região pode ser constituída de outro tipo de material, como nylon e fluoreto de polivinilideno, porém as tentativas de introduzir essas membranas no mercado tiveram um sucesso limitado, aparentemente devido a fatores que levam a nitrocelulose ser mais atrativa incluindo custo e produtos disponíveis com diferentes taxas de capilaridade (O'FARRELL, 2009; POSTHUMA-TRUMPIE et al., 2009).

A capilaridade da membrana de nitrocelulose é de extrema importância na produção de testes rápidos e pode influenciar na sensibilidade do teste. Baixa capilaridade é indicada quando a quantidade de amostra é limitada necessitando de alta sensibilidade do teste. Já a alta capilaridade é indicada quando há um excesso de amostra e a sensibilidade não é um fator limitante (FERREIRA & AVILA 1996; HENDERSON & STEWART, 2002; MOURA, 2011).

A membrana deve passar por alguns processos antes da montagem final do teste. Estes incluem deposição de proteínas nas linhas teste e controle, através de dispensadores quantitativos, e posterior secagem a temperatura elevada e também processos de imersão para o bloqueio, com finalidade de evitar a ligações inespecíficas (O'FARRELL, 2009).

### **Filtro de adsorção**

O filtro absorvente é posicionado na extremidade distal da membrana de nitrocelulose e tem como finalidade puxar todo o fluido adicionado no teste assegurando que não ocorra a volta deste material, evitando assim falsos positivos. O material é tipicamente uma celulose de alta densidade (SAJID et al., 2014).

## **NANOPARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL**

A maioria dos testes rápidos comerciais disponíveis (cerca de 94%) usam partículas de ouro coloidal (KARAKUS & SALIH, 2013), mas podem também ser empregadas no teste: partículas de látex coloridas (GREENWALD et al., 2003), partículas magnéticas (NOR et al., 2012) e moléculas fluorescentes (XIE et al., 2014). As pesquisas acadêmicas que desenvolvem esses testes mostram que o ouro é o mais utilizado (SHYU et al., 2010; DRYGIN et al., 2012; ROCHA, 2012; WIDIYANTI et al., 2013; YONEKITA et al., 2013; VIJAYAN et al., 2013; CHO & IRUDAYARAJ, 2013; WANG et al., 2014), por apresentam vantagens de possuírem superfícies com alta afinidade para proteínas e biomoléculas, o que aumenta os sinais do imunoenensaio e permite um fluxo regular através da membrana, além se ser mais estável e fácil de usar (LIU et al., 2011; KAVOSI et al., 2014).

Os métodos de preparo de partículas de ouro coloidal são baseados na redução aquosa de ácido tetracloroaúrico (HAuCl<sub>4</sub>) usando diferentes tipos e quantidades de agentes redutores. A formação de uma partícula de ouro coloidal se dá pelo aparecimento de vários núcleos icosaédricos formados no início da reação com o agente redutor, como também pela velocidade de condensação de uma maior quantidade de ouro ao redutor do núcleo já formado. Dependendo do tipo ou da

quantidade dos agentes redutores, há a formação de uma quantidade variável de núcleos centrais. Desta maneira, quanto mais rápida for a redução, uma maior quantidade de núcleos centrais será formada e conseqüentemente as partículas de ouro coloidal serão menores (HANDLEY, 1989; DISCIPIO, 1996; GORUP, 2010; WANG et al., 2014).

O tamanho das partículas de ouro varia entre 2 e 150 nanômetros (nm), que pode ser controlado durante a produção e observado por microscopia eletrônica (BASTUS et al., 2011). Quando há a comparação entre os tamanhos, pode-se observar que a sensibilidade do teste é maior usando partículas maiores, no entanto, a estabilidade do ouro pode diminuir em partículas com mais de 40 nm (LAITINEN & VUENTO, 1996; JIN et al., 2005; AVEYARD et al., 2007).

### **ANTICORPOS**

As utilizações de anticorpos monoclonais ou policlonais nos testes de diagnóstico são de extrema importância. Anticorpos monoclonais são derivados de somente um linfócito B, selecionado artificialmente e replicado diversas vezes como um clone, reconhecendo somente um epítipo do antígeno. Já os anticorpos policlonais derivam de diferentes linhagens de linfócitos B e reagem com vários epítopos dos antígenos. Assim, a utilização de ambos os anticorpos no mesmo ensaio conferem a sensibilidade e a especificidade de um teste (SVENNERHOLM et al., 1986; ROCHA, 2012).

Várias pesquisas demonstram a utilização tanto de anticorpos monoclonais (DRYGIN et al., 2012; WIDIYANTI et al., 2013; KARAKUS & SALIH, 2013; VIJAYAN et al., 2013; CHO & IRUDAYARAJ, 2013) como os policlonais (DRYGIN et al., 2012; KARAKUS & SALIH, 2013; WANG et al., 2014) para produção desses testes. Tais anticorpos podem ser sensibilizados na linha teste e controle ou serem conjugados com nanopartículas de ouro coloidal.

### **CONJUGAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL COM ANTICORPOS**

Esta etapa é de extrema importância para a produção do teste. Além da conjugação de nanopartículas com anticorpos, o ouro pode ser conjugado com antígenos (KARAKUS & SALIH, 2013) e peptídeos antimicrobianos (YONEKITA et al., 2013), porém a maioria dos estudos utilizam a imunoconjugação ouro coloidal com anticorpos, sendo esse o foco desta revisão.

O processo depende de vários fatores, incluindo a estrutura terciária da proteína, pH, força iônica e temperatura. A adição de proteínas ao ouro coloidal em um valor de pH menor do que o ponto isoelétrico (pI) da proteína pode resultar em uma rápida agregação das partículas de ouro. Conforme o pH da solução coloidal aumenta acima do pI da proteína, a quantidade de proteína adsorvida poderá diminuir, devido ao aumento de cargas negativas presentes na proteína. (MAMEDOVA et al., 2001; SANG et al., 2007).

As variações de pH para conjugação vão desde pH ácido até pH alcalino, variando entre pH 4,5 até pH 9 (SHYU et al., 2010; WIDIYANTI et al., 2013; WANG et al., 2014; ZANG et al., 2015). A escolha de qual variação de pH estabelecer para a conjugação depende do ponto isoelétrico de cada proteína.

A concentração de proteína a ser conjugada varia de 0,01mg/mL a 1 mg/mL. Estas proteínas são adicionadas com nanopartículas e incubadas por algumas horas à temperatura ambiente. Após centrifugação, o pellet é suspenso com um agente

estabilizante para prevenir a adicional adsorção de proteínas ao ouro coloidal, bem como o bloqueio de sítios livres de ligação ainda presentes na superfície do ouro. Esses agentes podem ser: albumina de soro bovino e polietilenoglicol. De maneira geral pode-se determinar o pH ótimo e a concentração correta de proteínas através de técnicas bioquímicas e por espectrofotometria (MAMEDOVA et al., 2001; RAYAVARAPU et al., 2007).

## **FORMATOS DE TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS**

Diferentes formatos de testes rápidos estão disponíveis no mercado e nas pesquisas acadêmicas. O *design* de um teste pode ser mudado conforme a necessidade da pesquisa, mas basicamente os formatos são sanduíche, indireto e multiplex.

### **Formato sanduíche**

Neste formato é possível a detecção de anticorpos e também de antígenos. Quando o intuito de detecção é anticorpos, o teste necessita da conjugação de antígenos com partículas de ouro, que são sensibilizados no suporte do conjugado. Antígenos não marcados são imobilizados na linha de teste e de forma semelhante anticorpos anti-antígeno são imobilizados na linha de controle. A adição da amostra conduz a um escoamento lateral do fluido contendo anticorpos para o suporte do conjugado onde se liga ao antígeno revestido em partículas de ouro. O complexo, em seguida, flui para a linha de teste onde se liga ao antígeno resultando na presença de coloração. O fluxo irá continuar até a linha controle e os restantes de partículas de ouro conjugados ligam-se ao anticorpo imobilizado, originando uma linha colorida. Se o teste for negativo, apenas a linha controle apresenta a coloração, não ocorrendo ligações na linha teste (PENG et al., 2007; PENG et al., 2008).

Considerando este formato para detecção de antígenos, anticorpos anti-antígeno revestidos com partículas de ouro são imobilizados no suporte do conjugado, enquanto o mesmo anticorpo, porém não conjugado, estão presentes na linha teste e anticorpos anti-IgG na linha controle. A adição do material suspeito leva a um escoamento de fluxo lateral e a amostra contendo antígenos se liga ao anticorpo conjugado com partículas de ouro. O complexo, em seguida, flui para a linha de teste onde se liga ao anticorpo imobilizado e resultando no aparecimento de cor. O fluido continua para a linha de controle quando o restante de partículas de ouro conjugado irá ligar-se aos anticorpos anti-IgG imobilizadas resultando em uma linha colorida (PENG et al., 2007; PENG et al., 2008).

### **Formato indireto para detecção de anticorpos**

Neste formato anticorpos anti-IgG da espécie pesquisada no teste é conjugado com ouro coloidal e sensibilizados no suporte do conjugado. Na linha teste a sensibilização é com antígenos e na linha controle com uma proteína que se ligue ao conjugado, como por exemplo uma proteína A. A adição da amostra conduz a um escoamento lateral, o fluido se liga ao conjugado e segue em direção a linha teste onde está o antígeno, gerando coloração, o fluido continua para a linha de controle onde obrigatoriamente deve haver a presença de cor validando desta forma o teste (POSTHUMA-TRUMPIE et al., 2009; KARAKUS & SALIH, 2013; SAJID et al., 2014).

Outro formato indireto para detecção de anticorpos envolve a conjugação de partículas de ouro com antígenos e sensibilização no suporte do conjugado. Anticorpos anti-espécie pesquisada são imobilizados na linha de teste e de forma semelhante anticorpos anti-antígeno são imobilizados na linha de controle. Com a adição do material ocorre um escoamento lateral da amostra contendo anticorpos específicos para o suporte do conjugado onde ocorre a primeira interação. O complexo, em seguida, flui para a linha de teste onde se liga ao anticorpo imobilizado resultando na presença de cor. O fluxo da amostra continua para a linha de controle interagindo com anticorpos gerando coloração (POSTHUMA-TRUMPIE et al., 2009; KARAKUS & SALIH, 2013; SAJID et al., 2014).

### **Formato multiplex**

O formato multiplex detecta a partir de uma única amostra mais de um antígeno ou mais de um anticorpo, dependendo do *design* do teste. Para elaboração deste formato, combinações dos formatos citados nos itens anteriores são necessárias. Basicamente, o antígeno ou o anticorpo deve estar conjugado e sensibilizado no suporte do conjugado. Linhas testes devem conter anticorpos ou antígenos contra os alvos pesquisados, e na linha controle deve ocorrer a ligação com o restante do conjugado (FENTON et al., 2009).

Estudos mostram a utilização do teste rápido em formato multiplex para detecção de diferentes tipos de papilomavirus humano (XIU et al., 2014), aflatoxina B1, zearalenona, desoxinivalenol em cereais (XU et al., 2014), zearalenona e fumonisina B1 (WANG et al., 2013), detecção de diferentes sorogrupos de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (YONEKITA et al., 2013). A detecção de mais de um alvo em um único teste é a vantagem deste formato, porém é necessária uma padronização da técnica visando adequada quantidade de conjugado para que este seja consumido no decorrer do teste.

## **APLICAÇÃO DE TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS DE FLUXO LATERAL**

### **Diagnóstico de doenças**

Grande parte dos testes rápidos visa o diagnóstico de doenças através da detecção de antígenos ou anticorpos. As pesquisas mostram estudos detectando o vírus da dengue (EDWARDS & BAEUMNER, 2006), potato vírus (DRYGIN et al., 2012), *spherical vírus* que acomete tartarugas (ZANG et al., 2015), detecção de antígenos para *Leptospira spp10*, *Escherichia coli* produtora da toxina shiga46, *Helicobacter pylori* (KARAKUS & SALIH, 2013), *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* (VIJAYAN et al., 2013), *Listeria monocytogenes* (CHO & IRUDAYARAJ, 2013) e trematódeos do gênero *Paragonimus* (WANG et al., 2014).

Para o diagnóstico baseado na detecção de anticorpos, estudos mostram testes que detectam anticorpos contra *Brucella* (CLAVIJO et al., 2003), *Leptospira* (GUSSENHOVEN et al., 1997), detecção de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* (MIORANZA, 2009), anticorpos IgM contra o PGL-I antígeno específico de *Mycobacterium leprae* (MOURA, 2011).

Tanto a detecção de anticorpos como a de antígenos nos testes rápidos, são ferramentas importantes para elaboração de um diagnóstico visando posterior tratamento e controle das doenças de forma rápida.

## **Detecção de resíduos de medicamentos veterinários**

A questão de resíduos de medicamentos veterinários em produtos de origem animal levou ao desenvolvimento de legislações e regulamentações no âmbito nacional e internacional com intuito de propor e harmonizar os limites máximos destes resíduos, sendo o monitoramento feito em laboratórios oficiais (ANADON et al., 2002). Diante disto, vários estudos foram realizados com o objetivo de desenvolver testes rápidos para a detecção de resíduos de medicamentos veterinários em diversas amostras.

Testes podem ser encontrados para detecção de ofloxacina em urina de suínos (SUN et al., 2007) e em carne de aves e suínos (BYZOVA et al., 2014), enrofloxacin em músculos de aves (ZHAO et al., 2008), cloranfenicol no leite (BYZOVA et al. 2010), ractopamina e clenbuterol em urina de suínos (ZANG et al., 2009).

## **PERSPECTIVAS**

Comercialmente, muitos testes rápidos de diagnósticos estão disponíveis, e em nível acadêmico, muitas pesquisas são desenvolvidas. Limitações para produções de testes imunocromatográficos estão presentes. ZHAO et al., (2008) produziram testes com sensibilidade elevada. Em contradição, alguns estudos demonstram que a sensibilidade pode ser um fator limitante do teste, assim sendo, um meio para amplificar o sinal do ouro é adotando a utilização do reagente de prata, conhecido como "*silver enhancement*", que gera uma coloração na zona de teste muito maior devido à deposição de prata sobre a superfície do ouro (YANG et al., 2011; ANFOSSI et al., 2013). RONG-HWA e colaboradores em 2010 utilizaram o reagente de prata, conseguindo um aumento na sensibilidade do teste detectando até 0,01ng/ml de enterotoxina B de estafilococos, sendo que sem a adição do reagente, o limite de detecção foi de 1ng/mL. Outro estudo mostra que a sensibilidade aumentou 100 vezes em comparação ao ensaio convencional (WANG et al., 2011). Apesar de ser uma etapa adicional do teste, a utilização de reagente de prata pode ser elaborada para utilização em futuros testes.

Outra abordagem alternativa para aumentar o limite de detecção é a introdução de enzimas como marcadores para o desenvolvimento de biossensores e bioensaios (KIBA et al., 2012; PAROLO et al., 2013; TUFANÁZ, 2013; YAMAGUCHI et al., 2013). Parolo e colaboradores em 2013 apresentaram uma combinação da enzima peroxidase de rábano com ouro coloidal para a detecção de IgG humana, produzindo produtos mais escuros para aumentar amplificação do sinal. Porém quando se utiliza enzima, um elemento biológico com estabilidade limitada é introduzido, podendo diminuir a validade do teste.

A leitura da maioria dos produtos disponíveis é realizada visualmente, e os resultados são obtidos de modo qualitativo. A evolução destes testes envolve detecções mais precisas, que possam gerar resultados quantitativos, para isto o sinal pode ser digitalizado usando scanner e analisados por software (VAN AMERONGEN et al., 1995; VAN AMERONGEN et al., 2005). LI e colaboradores, em 2013, detectaram de forma quantitativa clenbuterol na urina de suínos através de LED de alta potência usado como emissor de luz. O sinal óptico refletor a partir da tira foi filtrado por um filtro óptico e focado por um par de lentes ópticas e, em seguida convertida em sinais fotoelétricos pelo módulo de conversão. O limite de detecção de clenbuterol por este sistema quantitativo foi de 220 pg / mL. Se por um lado esta etapa de quantificar amostras poderia aumentar os custos e o tempo de

análise, por outro a quantificação diminui a interpretação subjetiva, permite o armazenamento de dados e é mais sensível do que a observação visual.

Uma tendência na produção dos testes imunocromatográficos é a detecção de mais de um alvo, ou seja, testes multiplex. Algumas pesquisas já focam neste tipo de identificação, sendo o formato muito útil para o diagnóstico onde os sinais clínicos de doenças são muito semelhantes. Pesquisas futuras podem ser, portanto, focadas no desenvolvimento de novos formatos com mais linhas de teste para detectar vários alvos em uma única amostra.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

Várias técnicas de diagnóstico estão disponíveis, como testes sorológicos e técnicas moleculares, todas com sua devida importância e vantagens, porém a procura por testes que pudessem gerar resultados de forma mais rápida ganhou força a partir de 2006, levando então ao crescimento dos testes conhecidos como testes imunocromatográficos de fluxo lateral ou apenas testes rápidos.

Apesar do processo de produção envolver conhecimentos biológicos, químicos, físicos e de engenharia as otimizações são possíveis e cada vez mais pesquisas com novos alvos são publicadas. O processo de conjugação de nanopartículas de ouro coloidal favorece o desenvolvimento de novas plataformas. Os vários formatos destes testes proporcionam possibilidades de mudanças no *design* de cada novo ensaio produzido, possibilitando aplicações em diversas áreas e com uma variedade de amostras.

O desafio dos pesquisadores é otimizar testes com boa sensibilidade e reprodutibilidade além de aprofundar os estudos voltados a quantificação das amostras. Portanto, a aperfeiçoamento no desempenho, qualidade, eficiência e *design* continuam a ser a chave para a evolução contínua e adoção desta tecnologia.

### REFERÊNCIAS

ANADON, A. ARNOLD, D. BOISSEAU, J. BOOBIS, A.R. ELLIS, R. GREENLEES, K, MCLEAN, J.G. MACNEIL, J. ROJAS MARTINEZ, J.L. MITEMA, E.S. PALERMONETO, J. SOBACK, S. STEPHANY, R.W. Evaluation of certain veterinary drug residues in food. **World Health Organization - Technical Report Series**. 2002.

ANFOSSI, L. DI NARDO, F. GIOVANNOLI, C. PASSINI, C. BAGGIANI, C. Increased sensitivity of lateral flow immunoassay for ochratoxin A through silver enhancement. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.405, p.9859-9867, 2013.

AVEYARD, J. MEHRABI, M. COSSINS, A. BRAVEN, H. WILSON, R. One step visual detection of PCR products with gold nanoparticles and a nucleic acid lateral flow (NALF) device. **Chemical Communicatios**. v.41, p.4251-4253, 2007.

BASTUS, N.G. COMENGE, J. PUNTES, V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: size focusing versus Ostwald ripening. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**. v.27, p.1088-1095, 2011.

BYZOVA, N.A. SMIRNOVA, N.I. ZHERDEV, A.V. EREMIN, S.A. SHANIN, I.A. LEI, H.T. SUN, Y. DZANTIEV, B.B. Rapid immunochromatographic assay for ofloxacin in

animal original foodstuffs using native antisera labeled by colloidal gold. **Talanta**. v.119, p.125-132, 2014.

BYZOVA, N.A. ZVEREVA, E.A. ZHERDEV, A.V. EREMIN, S.A. DZANTIEV, B.B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk. **Talanta**. v.81, p.843-48, 2010.

CHO, I.H. IRUDAYARAJ, J. Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.10, p.3313-3319, 2013.

CLAVIJO, E. DIAZ, R. ANGUITA, A. GARCIA, A. PINEDO, A. SMITS, H.L. Comparison of a dipstick assay for detection of *Brucella*-specific immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnosis of human brucellosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.10, p.612-615, 2003.

DISCIPIO, R.G. Preparation of colloidal gold particles of various sizes using sodium borohydride and sodium cyanoborohydride. **Analytical Biochemistry**. v.236, p.168-170, 1996.

DRYGIN, Y.F. BLINTSOV, A.N. GRIGORENKO, V.G. ANDREEVA, I.P. OSIPOV, A.P. VARITZEV, Y.A. USKOV, A.I. KRAVCHENKO, D.V. ATABEKOV, J.G. Highly sensitive field test lateral flow immunodiagnostics of PVX infection. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.1, p.179-189, 2012.

EDWARDS, K.A. BAEUMNER, A.J. Optimization of DNA-tagged dye-encapsulating liposomes for lateral-flow assays based on sandwich hybridization. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.386, p.1335-1343, 2006.

FENTON, E.M. MASCARENAS, M.R. LOPEZ, G.P. SIBBETT, S.S. Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping. **ACS Applied Materials & Interfaces**. v.1, p.124-129, 2009.

FERREIRA, A.W. ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitárias e autoimunes. Correlação clínico-laboratorial**. Rio de Janeiro.1996.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. ed ufsm, cap. 17, p. 433-488, 2007.

GORUP, F.L. **Nanopartículas coloidal de ouro e pratae sua funcionalização com Dibutil-Dicalcogenetos**. 2010. Dissertação. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

GREENWALD, R. ESFANDIARI, J. LESELLIER, S. HOUGHTON, R. POLLOCK, J. AAGAARD, C. ANDERSEN, P. HEWINSON, R.G. CHAMBERS, M. LYASHCHENKO, K. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v.46, p.197-203, 2003.

GUSSENHOVEN, G.C. VAN DER HOORN, M.A. GORIS, M.G. TERPSTRA, W.J. HARTSKEERL, R.A. MOL, B.W. VAN INGEN, C.W. SMITS, H.L. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **Journal of Clinical Microbiology**. v.35, p.92-97, 1997.

HANDLEY, D.A. **Methods for preparing colloidal gold**. Disponível em <https://books.google.com.br/books?id=9B19NiyNMyQC&pg=PA220&lpg=PA220&dq=Methods+for+preparing+colloidal+gold.+San+Diego:&source=bl&ots=shVza1A9IF&sig=4laMomJjl0m764t71R2409luGU&hl=ptBR&sa=X&ved=0CC0Q6AEwAGoVChMlr8Sb6bj7xglViQyQCh1VzQ3#v=onepage&q=Methods%20for%20preparing%20colloidal%20gold.%20San%20Diego%3A&f=false>.1989. Acesso em 02 jul 2015.

HENDERSON, K. STEWART, J. Factors influencing the measurement of oestrone sulphate by dipstick particle capture immunoassay. **Journal of Immunological Methods**. v.270, p.77-84, 2002.

JIN, S. CHANG, Z.Y. MING, X. MIN, C.L. WEI, H. SHENG, L.Y. HONG, G.X. Fast dipstick dye immunoassay for detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies of human toxoplasmosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.12, p.198-201, 2005.

KARAKUS, C. SALIH, B.A. Comparison of the lateral flow immunoassays (LFIA) for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Immunological Methods**. v.396, p. 8-14, 2013.

KAVOSI, B. HALLAJ, R. TEYMOURIAN, H. SALIMI, A. Au nanoparticles/PAMAM dendrimer functionalized wired ethyleneamine-viologen as highly efficient interface for ultra-sensitive alpha-fetoprotein electrochemical immunosensor. **Biosensors & bioelectronics**. v.15, p.389-396, 2014.

KIBA, Y. OTANI, Y. YASUKAWA, T. MIZUTANI, F. Electrochemical detection of redox species flowing in a nitrocellulose membrane and application to quantitative immunochromatography. **Electrochimica Acta**. v.81, p.14-19, 2012.

LAITINEN, M.P. VUENTO, M. Affinity immunosensor for milk progesterone: identification of critical parameters. **Biosensors & bioelectronics**. v.11, p.1207-1214, 1996.

LI, C. LUO, W. XU, H. ZHANG, Q. XU, H. AGUILAR, Z.P. LAI, W. WEI, H. XIONG, Y. Development of an immunochromatographic assay for rapid and quantitative detection of clenbuterol in swine urine. **Food Control**. v.34, p.725-732, 2013.

LIU, C. LIU, C. JIA, Q. YANG, C. QIAO, R. JING, L. WANG, L. XU, C. GAO, M. Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle aggregates as color reagents. **Analytical chemistry**. v.17, p.6778-6784, 2011.

Mamedova, N.N. Kotov, N.A. Rogach, A.L. Studer, J. Albumin-CdTe Nanoparticle Bioconjugates: Preparation, Structure, and Interunit Energy Transfer with Antenna Effect. **Nano Letters**. v.1, p.280-286, 2001.

MILLIPORE. **Rapid Lateral Flow Test Strips, Considerations for product development**. Darmstadt, 36p, 2013.

MIORANZA SL. **Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos igg anti-toxoplasma gondii**. 2009.Tese. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas São Paulo.

MOURA, R. S. **Otimização e produção do teste rápido para controle da hanseníase (ML Flow)**. 2011. 121f. Dissertação. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Goiânia.

NGOM, B. GUO, Y. WANG, X. BI, D. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 3, p. 1113-1135, 2010.

NOR NM, RAZAK KA, TAN SC, NOORDIN R. Properties of surface functionalized iron oxide nanoparticles (ferrofluid) conjugated antibody for lateral flow immunoassay application. **Journal of Alloys and Compounds**. v.538, p.100–106,2012.

O'FARRELL B. **Evolution in Lateral Flow Immunoassay Systems**. In; Wong RC, Tse HY, editors. *Lateral Flow Immunoassay*.Springer, New York: Springer.p.1-34, 2009.

PAROLO, C. DE LA ESCOSURA-MUNIZ, A. MERKOCI, A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. **Biosensors & bioelectronics**, 40(1):412-416.2013.

PENG, D.P. HU, S.S. HUA, Y. XIAO, Y.C. LI, Z.L. WANG, X. BI, D. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.117, p.17–25, 2007.

PENG, F. WANG, Z. ZHANG, S. WU, R. HU, S. LI, Z. WANG, X. BI, D. Development of an immunochromatographic strip for rapid detection of H9 subtype avian influenza viruses. **Clinical and vaccine immunology**. v.15, p.569-574, 2008.

PLOTZ, C.M. SINGER, J.M. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. **The American Journal of Medicine**. v.21, p.888-892, 1956.

POSTHUMA-TRUMPIE, G.A. KORF, J. VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.393, p.569-82, 2009.

RAYAVARAPU, R.G. PETERSEN, W. UNGUREANU, C. POST, J.N. VAN LEEUWEN, T.G. MANOHAR, S. Synthesis and bioconjugation of gold nanoparticles as potential molecular probes for light-based imaging techniques. **International Journal of Biomedical Imaging**. 2007.

ROCHA, L.B. **Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**. 2012. Tese. Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, São Paulo.

RONG-HWA, S. SHIAO-SHEK, T. DER-JIANG, C. YAO-WEN, H. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. **Food Chemistry**. v.2, p.462-466, 2010.

SAJID, M. KAWDE, A.N. DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: a literature review. **Journal of Saudi Chemical Society**. 2014.

SHAN, S. LAI, W. XIONG, Y. WEI, H. XU, H. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.63, p.745-753, 2015.

SHANG, L. WANG, Y. JIANG, J. DONG, S. pH-dependent protein conformational changes in albumin:gold nanoparticle bioconjugates: a spectroscopic study. **Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids**. v.23, p.2714-2721, 2007.

SHYU, R.H. TANG, S.S. CHIAO, D.J. HUNG, Y.W. Gold nanoparticle-based lateral flow assay for detection of staphylococcal enterotoxin B. **Food Chemistry**. v.118, p.462-466, 2010.

SONG, S. LIU, N. ZHAO, Z. NJUMBE EDIAGE, E. WU, S. SUN, C. DE SAEGER, S. WU, A. Multiplex lateral flow immunoassay for mycotoxin determination. **Analytical Chemistry**. v.86, p.4995-5001, 2014.

SUN, W.Y. LIU, W.Y. QU, L.B. Development of ELISA and immunochromatographic assay for ofloxacin. **Chinese Chemical Letters**. v.8, p.1107-1110, 2007.

SVENNERHOLM, A.M. WIKSTROM, M. LINDBLAD, M. HOLMGREN, J. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stable toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1-enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v.4, p.585-590, 1986.

TUFANÁÍZ M. Nanoparticle embedded enzymes for improved lateral flow sensors. **Analyst**. v.138,p.4255-4259, 2013.

VAN AMERONGEN A, KOETS. **Rapid methods for biological and chemical contaminants in food and feed**. Wageningen Academic Publishers, Wageningen. p.105–126, 2005.

VAN AMERONGEN, A. VAN LOON, D. BERENDSEN, L.B.J.M. WICHERS, J.H. Quantitative computer image analysis of a human chorionic gonadotropin colloidal carbon dipstick assay. **Clinica Chimica Acta**. v.229, p.67–75, 1995.

VIJAYAN, T. CHILLER, T. KLAUSNER, J.D. Sensitivity and specificity of a new cryptococcal antigen lateral flow assay in serum and cerebrospinal fluid. **MLO: Medical Laboratory Observer**. v.3, p.16-20, 2013.

WANG, W. WU, W.Y. ZHONG, X. WANG, W. MIAO, Q. ZHU J.J. Aptamer-based PDMS-gold nanoparticle composite as a platform for visual detection of biomolecules with silver enhancement. **Biosensors & bioelectronics**. v.26, p.3110-3114, 2011.

WANG, Y. Wang, L. Zhang, J. Wang, G. Chen, W. Chen, L. Zhang, X. Preparation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of Paragonimiasis skrjabini. **PloS One**. v.3, p.2034-2039, 2014.

WANG, Y.K. Yan, Y.X. Ji, W.H. Wang, H.A. Li, S.Q. Zou, Q. Sun, J.H. Rapid simultaneous quantification of zearalenone and fumonisin B1 in corn and wheat by lateral flow dual immunoassay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.61, p.5031-5036, 2013.

WERSOM, E.S.S. MOTTA, L.R. BAZZO, M.L. FRANCHINI, M. JUNIOR, O.C.F. Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília: **Ministério da Saúde**. 56p, 2013.

WIDIYANTI, D. KOIZUMI, N. FUKUI, T. MUSLICH, L.T. SEGAWA, T. VILLANUEVA, S.Y. SAITO, M. MASUZAWA, T. GLORIANI, N.G. YOSHIDA, S. Development of immunochromatography-based methods for detection of leptospiral lipopolysaccharide antigen in urine. **Clinical and Vaccine Immunology**. v.20, p. 683-690, 2013.

XIE, Q.Y. WU, Y.H. XIONG, Q.R. XU, H.Y. XIONG, Y.H. LIU, K. JIN, Y. LAI, W.H. Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays. **Biosensors & Bioelectronics**. v.54, p.262-265, 2014.

XU Y, LIU, Y. WU, Y. XIA, X. LIAO, Y. LI, Q. Fluorescent probe-based lateral flow assay for multiplex nucleic acid detection. **Analytical Chemistry**. v.12, p.5611-5614, 2014.

YAMAGUCHI, M. MATSUDA, Y. SASAKI, S. SASAKI, M. KADOMA, Y. IMAI, Y. NIWA, D. SHETTY, V. Immunosensor with fluid control mechanism for salivary cortisol analysis. **Biosensors & bioelectronics**. v.41, p.186-191, 2013.

YANG, W. Li, X.B. Liu, G.W. Zhang, B.B. Zhang, Y. Kong, T. Tang, J.J. Li, D.N. Wang, Z. A colloidal gold probe-based silver enhancement immunochromatographic assay for the rapid detection of abrin-a. **Biosensors & bioelectronics**. v.26, p.3710-3713, 2011.

YONEKITA, T. OHTSUKI R, HOJO E, MORISHITA N, MATSUMOTO T, AIZAWA T, MORIMATSU F. Development of a novel multiplex lateral flow assay using an antimicrobial peptide for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli. **Journal of Microbiological Methods**. v.3, p.251-256, 2013.

ZHANG, L. LI, D. LIU, L. FANG, J. XU, R. ZHANG, G. Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for the rapid detection of soft-shelled turtle systemic septicemia spherical virus. **Journal of Microbiological Methods**. v.221, p.39-45, 2015.

ZHANG, M.Z. WANG, M.Z. CHEN, Z.L. FANG, J.H. FANG, M.M. LIU, J. YU, X.P. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v.395, p.2591-2599, 2009.

ZHAO, Y. ZHANG, G. LIU, Q. TENG, M. YANG, J. WANG, J. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of enrofloxacin residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, p.38-42, 2008.