

## **PADRONIZAÇÃO DE UMA METODOLOGIA IMUNOENZIMÁTICA PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO ZIKA VÍRUS.**

Alice Bianchi de Oliveira (PIBIC-AF-IS/CNPq//Uem), Fernando Américo Jorge, Dennis Armando Bertolini (Orientador), e-mail: dabertolini@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

**21104000 IMUNOLOGIA APLICADA**  
**21201013 VIROLOGIA**

**Palavras-chave:** ZIKV, diagnóstico, padronização.

### **Resumo**

A infecção pelo ZIKV é relativamente nova no Brasil, porém, estudos já mostraram associações graves com microcefalia fetal e síndrome de Guillain Barré. A sorologia para Flavivírus é complexa devido a extensa reatividade cruzada entre anticorpos produzidos pelas diferentes infecções por Flavivírus ou vacinação, mesmo para vírus pertencentes a diferentes sorogrupos. O objetivo deste estudo foi padronizar uma metodologia imunoenzimática para o diagnóstico sorológico do Zika vírus. Para esta padronização foi proposta uma metodologia de ensaio imunoenzimático utilizando uma proteína quimérica derivada da glicoproteína do envelope E1 do ZIKV e testada frente a amostras positivas e negativas. Os resultados obtidos apresentam algumas inconsistências, uma vez que as análises frente aos plasmas contendo IgM e IgG contra o ZIKV e os controles negativos estão apresentando reatividade. A proteína do envelope viral do Zika utilizada nesse estudo pode ser inespecífica, estar tendo reação do conjugado com a placa, excesso de revelador, excesso de concentração dos plasmas, entre outros. Os experimentos ainda estão em andamento para tentar solucionar esses problemas para dar seguimento a padronização da metodologia de EIE para Zika vírus.

### **Introdução**

O Zika vírus (ZIKV) é um vírus transmitido por artrópodes e membro do gênero *Flavivirus* pertencente à família *Flaviviridae*. É um vírus de RNA de fita simples, com polaridade positiva e envelopado.

No Brasil, o vírus chegou entre 2013 e 2014 causando um verdadeiro surto, especialmente na região do nordeste, onde ocorreu o pico do número de casos no país.

O diagnóstico clínico do ZIKV é muito difícil, uma vez que os pacientes infectados geralmente apresentam sintomas como febre, erupção cutânea,

artralgia, mialgia, fadiga, dor de cabeça e hiperemia conjuntival, que podem ser confundidos com outras patologias. A maior preocupação é a associação dessa infecção com a síndrome de Guillain Barré (SGB) e o nascimento de crianças com microcefalia de mães infectadas pelo ZIKV.

A sorologia para Flavivírus é complexa devido a extensa reatividade cruzada entre anticorpos produzidos pelas diferentes infecções por Flavivírus ou vacinação, mesmo para vírus pertencentes a diferentes sorogrupos (Ramdasi et al., 2014). Embora ensaios diagnósticos para dengue e Chikungunya já estejam melhores padronizados e comercialmente disponíveis, para o diagnóstico sorológico de Zika vírus isso ainda não é uma realidade. Resultados dos testes sorológicos poderiam ser analisados cuidadosamente devido a possibilidade de resultados falso-reagentes, tendo em vista a reatividade cruzada com outros flavivírus (Lanciotti et al., 2008). Ensaios preliminares de detecção de anticorpos IgG humanos anti-Zika por técnica imunoenzimática (EIE) utilizando células infectadas *in vitro* tem se mostrado promissoras (Sumita et al., 2016). Existem três testes sorológicos para ZIKV disponíveis ou que estarão disponíveis em breve, conforme afirmado por Charrel et al. (2016), no entanto, nenhuma informação do tipo de antígenos utilizados ou na validação específica para determinar reatividade cruzada é fornecida nos kits utilizados no Brasil.

O diagnóstico preciso da infecção por ZIKV é dificultado pelos sintomas que podem ser confundidos entre as infecções pelo vírus Chikungunya (CHIKV) e vírus da dengue (DENV) e as várias reações cruzadas nos testes imunológicos, que são mais baratos e rápidos. Assim, é necessária a busca de alternativas aos testes hoje existentes no mercado, visando um diagnóstico mais preciso e consequentemente maior eficácia no tratamento dessas doenças.

Desta forma, o objetivo deste estudo foi padronizar uma metodologia imunoenzimática para o diagnóstico sorológico do Zika vírus.

## Materiais e métodos

**Coleta de amostras:** As amostras de plasma dos pacientes positivos para IgM e IgG para a padronização da metodologia imunoenzimática (EIE) para os vírus Zika foram selecionadas e obtidas no Laboratório Central do Paraná (LACEN-PR) e no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá. Foram adquiridos plasmas contendo IgM e IgG contra o ZIKV (SeraCare, Milford, EUA).

**Sensibilização da placa:** Foi utilizada uma concentração de 5 uL/mL da proteína quimérica derivada da glicoproteína do envelope E1 do ZIKV para sensibilizar placas de poliestireno de 96 poços. Foi feita uma adsorção com 50 µL de solução de antígenos por poço, diluídos em tampão PBS e incubadas “overnight” a 4 °C.

**EIE (Ensaio-Imuno-Enzimático):** As placas foram lavadas com PBS Tween G e bloqueadas com 200 µL de leite mólico 5%, ficando incubadas 1 hora à 37°C. Foram lavadas com PBS Tween G (três vezes) e após isso, foram

adicionados os plasmas contendo IgM e IgG na concentração 1:20, nos primeiros poços, e diluídos até 1:2560. Os plasmas adicionados foram IgM e IgG em duplicatas. Os controles negativos utilizados foram amostras negativas para HIV, HBV e HCV. Foram incubados por 1 hora à 37°C e lavadas três vezes com PBS Tween G.

Foi adicionado conjugado anti-immunoglobulina humana-peroxidase (50 µL por poço). Após 1h de incubação a 37°C, foram feitas três lavagens com PBS Tween G e adicionado 50 µL de avidina por poço, na concentração 1:10.000, e incubada à 37°C/1h. A reação foi revelada com 50 µL de OPD (o-phenylenediamine-2HCl) 1 mg/mL em 0,05 M fosfato-citrato. A reação foi interrompida com 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M. A absorbância foi medida em leitora de EIE para microplacas a 492 nm e os níveis de anticorpos foram expressos em absorbância.

## Resultados e Discussão

	controles	plasma IgM+	plasma IgM+	plasma IgG+	plasma IgG+	C- HIV	C- HIV	C- HBV	C- HBV	C- HCV	C- HCV	nada
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bco	0,0376	0,2561	0,2859	0,0394	0,0401	0,3345	0,0431	0,3268	0,0814	0,1619	0,0385	
Bco	0,0389	0,143	0,1571	0,0413	0,0391	0,1801	0,0882	0,1694	0,0405	0,0951	0,0394	
Quentching	0,0402	0,1026	0,1092	0,0389	0,0402	0,1147	0,0395	0,1125	0,0403	0,1506	0,0403	
Quentching	0,0399	0,0745	0,0822	0,0429	0,0416	0,0863	0,0397	0,0817	0,0411	0,055	0,0411	
IgM s/soro	0,0422	0,0537	0,0595	0,0442	0,0439	0,0523	0,0445	0,0564	0,0406	0,048	0,0421	
IgG s/soro	0,0407	0,0505	0,0505	0,0393	0,0421	0,0465	0,0463	0,0481	0,0448	0,0449	0,0411	
C- IgM (1/20)	0,2068	0,0439	0,0427	0,0448	0,0417	0,0444	0,0412	0,044	0,0423	0,0421	0,04	
C- IgM (1/20)	0,2195	0,0437	0,0424	0,041	0,0395	0,0423	0,0406	0,042	0,0397	0,042	0,0403	

Figura 01- Placa 1. Sem a presença da avidina, sensibilizadas com a proteína do envelope de ZIKV e com plasmas infectados (duplicata de IgM nas colunas 2 e 3 e de IgG nas colunas 4 e 5). Plasmas negativos para ZIKV nas demais colunas. (Controles negativos: HIV, HBV e HCV.)

Na placa 1, na coluna 1 estão os controles negativos, porém os resultados mostram presença de anticorpos anti-ZIKV desde o primeiro poço: 0,0376, até o último poço: 0,2195. Nas colunas de 6 a 11, onde estão os plasmas controles negativos das outras doenças que também apresentaram reatividade para anti-ZIKV. Nas colunas de 2 a 5 estão os plasmas IgM e IgG conta ZIKV que apresentaram reatividade desde a primeira até a última diluição dos plasmas. Na coluna 12 não foi adicionado nada.

Leitura	492 nm			Conjug goat anti-IgM BIOTINA					Conjug goat anti-IgG BIOTINA						
				controles IgM	controles IgG	plasma IgM+ ZIKV	plasma IgG+ ZIKV	C- HIV	C- HBV	DENV IgM+	plasma IgM	plasma IgG	C- HIV	C- HBV	DENV IgM+
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
avd + opd	Bco	contr. não sensibilizados	A	0,6004	0,6172	0,5582	0,6208	0,5124	0,5781	0,7099	0,9073	1,0154	0,8796	0,9435	0,947
avd + opd	Bco		B	0,5844	0,4513	0,3222	0,4237	0,3176	0,3778	0,5482	0,7806	0,9869	0,8098	0,7796	0,8622
bloq+plasma	Quent		C	0,3868	0,9514	0,2291	0,311	0,2092	0,2396	0,3674	0,6922	0,9281	0,6444	0,6478	0,8566
bloq+plasma	Quent		D	0,5529	1,0024	0,161	0,2104	0,1526	0,1589	0,2512	0,5396	0,9211	0,4997	0,5409	0,6407
s/ soro	conjug		E	0,0388	0,0391	0,1069	0,1453	0,1006	0,1117	0,1848	0,3945	0,8085	0,3577	0,4263	0,5664
s/ soro	conjug		F	0,0388	0,0399	0,0797	0,1065	0,0743	0,0804	0,1204	0,2646	0,7525	0,2343	0,2655	0,4443
1/10	C- HIV		G	0,5017	0,9476	0,06	0,0766	0,0552	0,0626	0,0845	0,1701	0,5796	0,1394	0,1841	0,283
1/11	C- HBV		H	0,5088	0,876	0,0519	0,0608	0,048	0,0524	0,0632	0,1111	0,431	0,0894	0,1164	0,1839

Figura 02- Placa 2. Com avidina. Sensibilizada e com plasmas infectados com ZIKV nas colunas 3 e 4 com IgM, 8 e 9 com IgG. Plasmas negativos para ZIKV nas demais colunas. (Controles negativos: HIV, HBV e DENV IgM+)

Na placa 2, nas colunas 1 e 2 estão os controles negativos, porém, os resultados mostraram presença de reatividade para anticorpos anti-ZIKV

(Figura 02). Nas colunas 3, 4, 8 e 9 estão os plasmas IgM e IgG contra ZIKV, que também apresentaram reatividade em todas as diluições. Nas colunas 5, 6, 7, 10, 11 e 12 estão os controles negativos das outras doenças, porém, todas também apresentaram reatividade para o anti-ZIKV.

## Conclusões

Apesar de os plasmas com anticorpos IgM e IgG contra o ZIKV serem limitados a alguns poços, é possível ver, nas duas placas, a presença de reatividade em completamente todos, incluindo os controles negativos. Isso pode sugerir algumas hipóteses, como: a proteína do envelope viral do Zika utilizada nesse projeto ser inespecífica; estar ocorrendo reação do conjugado com a placa; excesso de revelador; excesso de concentração dos plasmas; tempo de incubação; número de lavagens; entre outros. Os experimentos ainda estão em andamento para tentar solucionar esses problemas e dar seguimento a padronização da metodologia de EIE para Zika vírus.

## Agradecimentos

A Fundação Araucária pela concessão da bolsa.

## Referências

- CHARREL, R. N., et al. **State of knowledge on Zika vírus for na adequate laboratory response.** Bull World Health Organ E pub: 10 Feb 2016.
- LANCIOTTI, R. S., et al. **Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007.** Emerging Infectious Diseases, v. 14, n. 8, p. 1232, 2008.
- LAZEAR, H. M., et al. **Zika vírus: novas síndromes clínicas e seu surgimento no hemisfério ocidental.** Journal of Virology, v. 90, n. 10, p. 4864-4875, 2016.
- RAMDASI, A. Y., et al. **Efeito da gravidez sobre os títulos de anticorpos anti-HEV, citocinas plasmáticas e os níveis de expressão gênica correspondentes em PBMCs de pacientes apresentando hepatite E. subclínica e clínica de autorrecuperação.** PLoS One, v. 9, n. 8, p. e103257, 2014.
- SUMITA, L. M., et al. **Detecção de IgG anti-zika vírus humano por ELISA usando um antígeno de células Vero infectadas in vitro: resultados preliminares.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 58, n. 89, p. 3-8, 2016.