

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA PORTÁTIL PARA O DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA DENGUE

Luiz R. Goulart¹, Paula S. Santos¹, Fausto E. Capparelli¹,
Ana Graci B. Madurro¹, João M. Madurro²,
Ana Paula S. Terra³, David Nascimento S. Teixeira³

A dengue é considerada a mais importante doença transmitida por mosquitos afetando humanos. Sua distribuição global é comparável à da malária, com aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivendo em áreas de risco, atingindo mais de 100 países por epidemias de dengue ou dengue hemorrágica. Anualmente, ocorrem mais de 50 milhões de casos de contágio de dengue e dengue hemorrágica, dos quais meio milhão são hospitalizados, com cerca de 20 mil mortes. Durante a infecção primária, o indivíduo desenvolve IgM após 5-6 dias e IgG após 7-10 dias. Na infecção secundária, altos níveis de IgG são detectáveis enquanto durar a fase aguda e aumentam consideravelmente até as duas semanas posteriores. Os métodos comumente usados para confirmar a infecção pela dengue envolvem o isolamento do vírus, a detecção do antígeno ou RNA do vírus no plasma ou soro ou tecidos e a presença de anticorpos vírus-específicos no soro e em outros fluidos. Mesmo com o uso recente de variadas técnicas para o diagnóstico laboratorial rápido do vírus da dengue, os ensaios ainda são demorados, com sensibilidades e especificidades variáveis. Diante da necessidade de diagnósticos mais precisos, sensíveis e rápidos, o objetivo principal desta investigação foi desenvolver um imunoenensaio com peptídeos específicos selecionados por Phage

Display para a detecção de IgM e IgG na resposta imunológica após a infecção pelo vírus da dengue, utilizando-se tecnologia eletroquímica. Para o desenvolvimento de marcadores para a dengue, galinhas foram imunizadas com antígenos inativados do vírus da dengue do tipo III produzidos em cérebros de camundongo. Anticorpo IgY imune foi purificado e confirmado por ELISA. Ligantes apresentados em uma biblioteca conformacional de peptídeos randômicos em fagos filamentosos M13 (Ph.D-C7C, New England Biolabs) foram selecionados sob três ciclos de seleção contra IgY policlonal. Vinte cinco clones foram selecionados e sequenciados, dos quais 12 representavam um mesmo clone (48%). As sequências foram traduzidas e alinhadas entre si na busca por motivos relevantes e contra o genoma da dengue. Dos 25 clones, 14 continham sequências específicas, gerando cerca de 169 prováveis motivos proteicos. Os peptídeos selecionados apresentaram grande similaridade com a poliproteína, proteína do envelope e da proteína não estrutural NS2B dos tipos virais da dengue. Ensaios imunoenzimáticos (ELISA) foram altamente significativos para os 14 clones selecionados e foram pré-validados com soros positivos para dengue tipo I e III. Uma nova seleção de peptídeos foi realizada contra anticorpos monoclonais para os quatro tipos virais

¹ Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Laboratório de Nanobiotecnologia.

lrgoulart@ufu.br
goulartlr@gmail.com

² Instituto de Química – Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia, Uberlândia, MG.

³ Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Laboratório Clínico, Uberaba, MG.

(DENV1, DENV2, DENV3, DENV4) e um anticorpo geral PAN utilizando uma segunda biblioteca de peptídeos (Ph.D 12, New England Biolabs). Peptídeos selecionados foram pré-validados com 50 soros de pacientes, e novas análises de bioinformática geraram diversos peptídeos específicos para os quatro tipos virais. O motivo proteico mais frequente foi utilizado posteriormente para a síntese de um peptídeo. Foram realizadas modificações na sequência como a adição dos resíduos “AC” no início e no final da molécula para manter a conformação e o reconhecimento da ligação ao fago. O peptídeo DV1-biotin também recebeu duas modificações adicionais na porção C-terminal: amidação da molécula e adição de uma molécula de biotina. A amidação colabora na estabilização da molécula e favorece o reconhecimento do peptídeo no imunensaio ELISA. A biotilação do peptídeo foi feita para utilizar o sistema de ligação biotina-estreptavidina, que consiste em forte ligação específica, sendo um suporte para aderir o peptídeo ao fundo da placa de ELISA, expondo-o de maneira ideal

para o reconhecimento pelos anticorpos. O peptídeo biotinilado foi testado com 31 amostras de soros de pacientes com dengue, 17 soros de pacientes saudáveis, 8 soros de indivíduos com doença não relacionada a vírus e 14 amostras de soros de indivíduos infectados por outras viroses. O teste ELISA foi eficaz em detectar IgM circulante e altamente significativo ($P < 0,001$), diferenciando os pacientes dos controles com excelente sensibilidade e especificidade (curva ROC = 0,9715). O peptídeo DV1-biotin foi incorporado em um bioeletrodo composto de grafite e modificado com ácido poli-3-hidroxifenilacético. A detecção direta foi demonstrada por impedância, voltametria com pulso diferencial e microscopia de força atômica. O sensor eletroquímico provou ser altamente seletivo, discriminando eficientemente o soro positivo do negativo. O protótipo desenvolvido com tecnologia eletroquímica associada ao marcador selecionado por Phage Display pode se tornar referência para o diagnóstico da dengue por ser uma técnica simples, reprodutível, rápida e sensível. ■