

# TESTES RÁPIDOS DE DIAGNÓSTICO PARA DETECÇÃO DO DENGUE VÍRUS EM AMOSTRAS DE PACIENTES E MOSQUITOS VETORES

Ronaldo Thomasini<sup>1</sup>, Fernanda Oliveira Ferraz<sup>1</sup>, Antonio Helvécio Tótola<sup>2</sup>, Oscar Bruna Romero<sup>1</sup>, Mauro Martins Teixeira<sup>1</sup>

O Dengue é atualmente considerado o mais importante arbovírus que afeta o homem em termos de morbidade e mortalidade. Infecções em humanos ocorrem pela picada de vetores artrópodes, principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* ou ainda pelo *Aedes albopictus*. A febre do Dengue constitui sério problema de saúde pública, sendo de importância particular em regiões tropicais e subtropicais do planeta. No mapa mundial, a distribuição geográfica da doença estende-se por cerca de 100 países, onde mais de 2,5 bilhões de pessoas correm o risco de ser infectadas. São conhecidos quatro sorotipos do vírus, nomeados como Den-1, Den-2, Den-3 e Den-4, sendo que a infecção pode ocorrer por qualquer dos quatro sorotipos. Em nosso país, as condições socioambientais favoráveis possibilitam a disseminação do transmissor e consequentemente elevam o número de casos da doença, atingindo milhares de brasileiros todos os anos. Nesse cenário epidemiológico, torna-se imprescindível a disponibilidade de produtos que apresentem desempenho satisfatório para a realização dos testes clínicos laboratoriais, para o rastreamento e/ou confirmação da presença do vírus em casos de epidemia. A confiabilidade no resultado laboratorial é de vital importância para a tomada de decisões e implementação de medidas de

maneira oportuna, visando principalmente ao controle da doença.

O objetivo deste projeto foi o de desenvolver um kit de diagnóstico molecular baseado na metodologia do PCR em tempo real para detecção do vírus do Dengue em soro de pacientes infectados e em vetores, desenvolver testes de ELISA para detecção de anticorpos IgM/IgG específicos para antígenos do vírus do Dengue no soro de pacientes infectados e um teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgM/IgG específicos para antígenos do vírus do Dengue e para detecção do antígeno NS1 no soro de pacientes infectados.

Para o desenvolvimento do ensaio de PCR em tempo real, trabalhamos primeiro com a padronização da purificação do RNA viral com base em amostras de soros de pacientes. Após a padronização da purificação, iniciadores específicos foram desenhados e testados. Selecionamos, então, um par de iniciadores capaz de detectar os quatro sorotipos virais nas amostras de soros de pacientes infectados. Para validação do PCR, 181 amostras de pacientes com suspeita de dengue foram analisadas através de PCR e de métodos imunoenzimáticos comerciais. A sensibilidade do ensaio de PCR foi de 88%, comparável aos ensaios imunoenzimáticos comerciais utilizados (89%). Os ensaios de PCR com amostras

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais  
mmtex@icb.ufmg.br

<sup>2</sup> Universidade Federal de São João del-Rei

de vetores capturados em armadilhas MosquiTRAP® não apresentaram resultados satisfatórios. Testes realizados em nosso laboratório indicaram que o RNA dos vetores capturados estava muito degradado, uma vez que os vetores já se encontravam mortos, e o processo de degradação dos RNAs é muito rápido. Estamos estudando uma solução para estabilizar os RNAs ou ainda a possibilidade de coletar os vetores em espaço de tempo mais curto.

Para o desenvolvimento dos ensaios e ELISA para detecção de anticorpos IgM / IgG específicos para antígenos da dengue, clonamos e produzimos uma proteína NS1 do vírus da dengue em bactérias *E. coli* XL1 Blue. Essa proteína foi utilizada para sensibilizar as placas de ELISA como antígeno de captura para anticorpos presentes no soro de pacientes infectados. Também testamos o reconhecimento da proteína produzida empregando kits comerciais de detecção de NS1. A proteína NS1 recombinante foi reconhecida tanto pelos ensaios comerciais quanto pelo soro de pacientes infectados. Nos ensaios de ELISA, os soros de pacientes infectados apresentaram leitura de absorbância da ordem de cinco vezes o valor de Cut off dos soros negativos. Estamos agora trabalhando, juntamente com a empresa associada, na padronização e na estabilização dos reagentes do ensaio de ELISA para submetermos esse aos testes de validação.

Durante o desenvolvimento dos ensaios imunocromatográficos para detecção rápida de anticorpos anti NS1 no soro de pacientes infectados, deparamo-nos com a necessidade de utilização de anticorpos específicos para essa proteína para a produção desses ensaios. Utilizando a proteína NS1

recombinante por nós produzida, fomos capazes de detectar anticorpos IgM no soro de pacientes infectados, utilizando anticorpos IgY policlonais anti NS1 produzidos e purificados em nosso laboratório. Tais anticorpos foram conjugados com Ouro coloidal e utilizados para a detecção de NS1 no soro dos pacientes. Os resultados foram bastante satisfatórios. Entretanto, para o desenvolvimento de um ensaio mais sensível, precisamos produzir outro conjunto de anticorpos capaz de reconhecer epitopos diferentes na proteína NS1. Nosso grupo está trabalhando, agora, no desenvolvimento de anticorpos monoclonais para utilização nos ensaios imunocromatográficos, com o objetivo de aumentar a sensibilidade deles.

O kit de PCR em tempo real desenvolvido foi disponibilizado para a empresa associada, na forma de protótipo suficiente para 100 reações, e a empresa está trabalhando no desenvolvimento final dele. O ensaio de ELISA encontra-se em estágio final de desenvolvimento (padronização e estabilização dos reagentes), para ser, então, submetido a análises finais de sensibilidade e especificidade. Os testes imunocromatográficos ainda estão em desenvolvimento, uma vez que precisamos obter os anticorpos necessários para produzirmos um ensaio com a sensibilidade desejada.

**Apoio financeiro:** Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais); Finep (Financiadora de estudos e projetos); CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Este trabalho foi desenvolvido em parceria com as empresas ECOVEC e BIOCLIN-QUIBASA. ■