

**SAMUEL SANTOS PEREIRA**

**Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico  
sorológico para tipagem da infecção prévia pelo vírus Dengue**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Corrigida

São Paulo

2019

## RESUMO

PEREIRA, S. S. **Desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico sorológico para tipagem de infecção prévia pelo vírus Dengue.** 2019. 77 f. Dissertação de (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A dengue é a arbovirose de maior impacto na saúde pública mundial. A doença é causada pelo vírus Dengue (DENV), o qual compreende quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus, como consequência a infecção por um deles não implica em proteção contra os sorotipos heterólogos. O diagnóstico clínico diferencial da dengue é difícil, por isso o diagnóstico laboratorial aparece como uma importante ferramenta para a confirmação dos casos suspeitos. Os testes sorológicos na plataforma de ELISA são amplamente utilizados na confirmação laboratorial da dengue, pois são sensíveis e de custo acessível. No entanto, apresentam especificidade comprometida, particularmente, em regiões onde circulam outras arboviroses. Nesse sentido, o objetivo desta proposta foi desenvolver estratégias de diagnóstico sorológico específico da dengue na plataforma de ELISA utilizando proteínas recombinantes baseadas em um fragmento da NS1 (nomeadas  $\Delta$ NS1 dos DENVs 1-4). Os antígenos foram obtidos após expressão em sistema procarioto utilizando linhagens de *Escherichia coli* e purificados por cromatografia de afinidade. As proteínas recombinantes purificadas foram reconhecidas por soros de animais infectados pelos DENVs, sugerindo que as mesmas conservam epítomos conformacionais. As  $\Delta$ NS1 dos DENVs 1-4 foram utilizadas em combinação como antígenos de fase sólida e permitiram a detecção de anticorpos gerados em animais infectados com os DENVs, sem a interferência de anticorpos gerados após infecção pelo ZIKV. Além disso, as  $\Delta$ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4 apresentaram maior reatividade com o soro do DENV homólogo. Os resultados obtidos são relevantes ao apresentarem novos imunobiológicos com antigenicidade, imunogenicidade preservadas e contribuem para o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico sorológico específico para dengue.

**Palavras-chave:** vírus Dengue. Diagnóstico sorológico. Proteína Não Estrutural 1 (NS1). ELISA.

## ABSTRACT

PEREIRA, S. S. **Development of a new serological diagnostic strategies for typing prior infection with Dengue virus.** 2019. 77 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Dengue is the arbovirose with larger impact on public health worldwide. The disease is caused by the Dengue virus (DENV), that comprises four antigenically distinct serotypes of the virus in such a way that infection by one then does not imply protection against the heterologous serotypes. The clinical diagnosis of dengue is hard and therefore the laboratory diagnosis is an important tool to confirm of suspected cases. Serological tests on the ELISA platform are widely used for dengue infection diagnosis, because they are sensitive and affordable. However, their specificity is compromised particularly in regions where others arboviruses prevail. Therefore, the aim of this study was to develop specific serological diagnostic strategies for dengue in the ELISA platform using recombinant proteins developed from a fragment of NS1 protein (named  $\Delta$ NS1 of the DENVs 1-4). The antigens were obtained after expression in prokaryotic system using *Escherichia coli* strains and purified by affinity chromatography. Importantly, the purified recombinant proteins were recognized by sera from animals infected by DENVs, suggesting that  $\Delta$ NS1 antigens have their conformational epitopes preserved. Moreover, the  $\Delta$ NS1 of DENVs 1-4 were used in combination as solid phase antigens and allowed the detection of DENV in the sera from infected animals, without cross reaction with antibodies after ZIKV infection. In addition, the  $\Delta$ NS1 of the DENVs 1, 2 and 4 showed higher reactivity with the sera of the homologous DENV, thus indicating their potential as tools to specifically identify DENV serotypes. The results are relevant and present novel immunobiologicals with preserved antigenicity, immunogenicity and can contribute to the development of new serological diagnostic strategies specific for dengue infection.

**Keywords:** Dengue virus. Serological diagnostic. Non structural protein 1 (NS1). ELISA.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 O VÍRUS DENGUE: IMPORTÂNCIA E IMPACTO EPIDEMIOLÓGICO

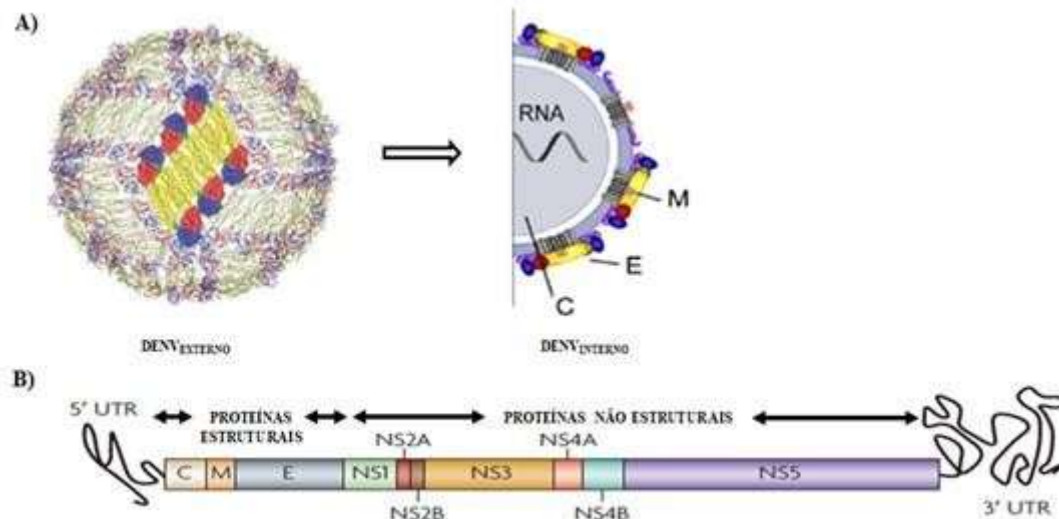
A dengue consiste na mais importante infecção viral transmitida aos seres humanos por vetores artrópodes (1). A doença, causada pelo vírus Dengue (DENV), é caracterizada como febril e autolimitada, e existem quatro sorotipos antigenicamente distintos do vírus (DENVs 1-4). A infecção por um dos DENVs confere imunidade sorotipo-específica de longa duração, entretanto, imunidade cruzada contra o sorotipo heterólogo pode ser observada por um curto período (1). O DENV pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae*, grupo que compreende mais de 70 espécies diferentes de vírus de grande impacto na saúde pública mundial, como o vírus Zika (ZIKV), vírus da Febre Amarela (YFV), vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da Encefalite Japonesa (JEV) (2,3).

Estima-se que metade da população mundial esteja em áreas de risco para infecção pelo DENV, e a Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que mais de cem países já relataram casos da doença (2,3). Além disso, uma preocupação pertinente é a expansão do vírus para regiões não endêmicas, como os Estados Unidos e países da Europa (2). Anualmente, são registrados mais de 50 milhões de casos de dengue em todo o mundo, mas acredita-se que esse número esteja subestimado, pois cerca de 75-80 % dos casos são de doença assintomática e não diagnosticada. Do total de casos registrados, 500 mil correspondem à dengue grave, que resultam em 20.000 mortes por ano (4,7).

Desde 2010 circulam no Brasil os quatro sorotipos do DENV, responsáveis por epidemias cíclicas da doença que apenas nos anos de 2017 e 2018 levaram a aproximadamente 250 mil casos anuais prováveis da doença identificados pelo Ministério da Saúde. Atualmente, são mais de 100 mil casos prováveis, sendo esse número três vezes maior do que o reportado para o mesmo período em 2018 (Ministério da Saúde do Brasil, 2019). A rápida expansão dos DENVs pelo país, assim como por outras áreas de clima tropical, ocorre devido à excelente capacidade de vetorização do vírus por mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (4). Diversas ferramentas para o controle do vetor estão disponíveis ou em desenvolvimento, tais como uso de larvicidas e mosquitos geneticamente modificados, que embora representem uma importante estratégia para o controle de arboviroses, requerem planejamento e intensa participação social (9).

O vírus Dengue é uma partícula esférica, envelopada, com simetria icosaédrica e diâmetro de aproximadamente 40-50 nm (figura 1 A). O DENV possui como genoma uma molécula de RNA (~11Kb) de fita simples e orientação positiva, responsável por codificar apenas uma poliproteína que, após clivagem proteolítica, dá origem a três proteínas estruturais componentes da partícula viral: a proteína do envelope (E), a precursora de membrana (prM) e a do capsídeo (C). Após a clivagem, são formadas também sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5) relacionadas com a evasão à resposta imune, replicação e patogênese viral (figura 1 B) (10). A identidade compartilhada do genoma entre os sorotipos é de aproximadamente 65% (2,11). A diversidade de sorotipos e genótipos do vírus Dengue está associada às pressões seletivas do meio ambiente e ao próprio sistema imunológico do hospedeiro (12). Essas divergências genéticas refletem-se no *fitness* viral, virulência e potencial epidêmico, logo o monitoramento específico de cada um dos sorotipos, apesar de complexo, mostra-se importante para o planejamento das ações de saúde pública (13).

A infecção pelo vírus Dengue pode apresentar-se de forma assintomática (75 % dos casos), febril ou mesmo como doença grave (14). Ainda não existe tratamento específico para a dengue, estando o mesmo limitado ao suporte terapêutico voltado apenas à redução dos sintomas que incluem, além da febre, dores de cabeça e retro-orbital, artralgias, mialgia, linfadenopatia e erupções cutâneas. As manifestações mais graves da dengue, que abrangem os distúrbios hemorrágicos como sangramentos de mucosa e gastrointestinal, estão associadas às infecções secundárias pelo DENV, dependem da idade e sexo dos indivíduos, bem como do sorotipo do vírus circulante (2,14). Sabe-se ainda que infecções secundárias, em especial, por um sorotipo diferente estão relacionadas com doença severa e fazem da avaliação clínica e diagnóstico pontos importantes na assistência ao paciente (15).



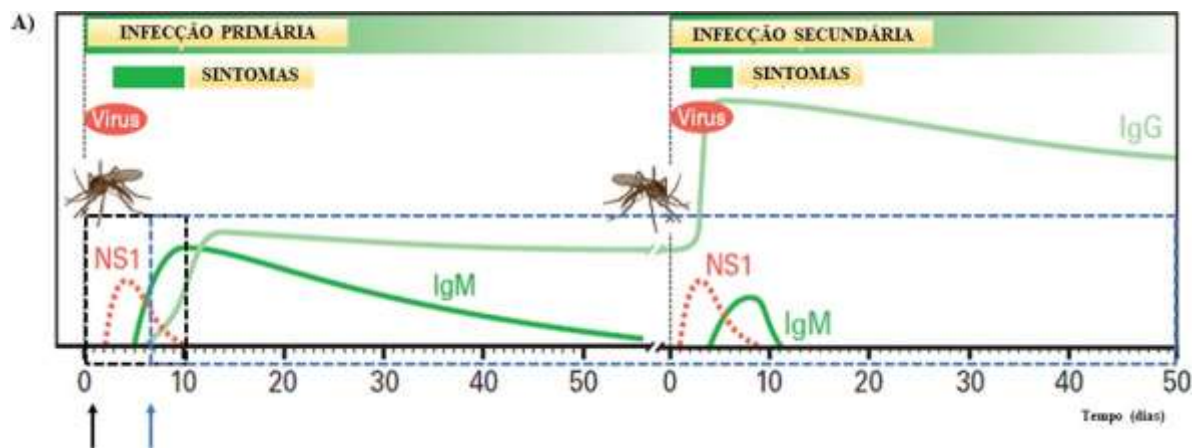
**Figura 1 - O vírus Dengue: representação da partícula e do genoma viral.** O DENV expressa uma poliproteína que dá origem às proteínas estruturais e não estruturais do vírus, após a clivagem proteolítica. Descrição: (A) Representações esquemáticas da partícula viral, evidenciando a estrutura dimérica da proteína E, o capsídeo viral C, a proteína M e o genoma (RNA). (B) Estrutura do RNA fita simples, em destaque os genes que codificam as proteínas estruturais (C, M e E), não estruturais (NS1-5) e as regiões UTR (regiões não traduzidas). Adaptado de Mukhopadhyay et. al., 2005 e Guzman et. al., 2010; Heinz Stiasny, 2012 (2,3,16).

## 1.2 O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DENGUE

O diagnóstico laboratorial da dengue representa uma importante alternativa ao diagnóstico clínico, que é de grande dificuldade, pois as manifestações clínicas da dengue são semelhantes à hepatite, malária, leptospirose e outras doenças tropicais, particularmente, arboviroses como zika e chikungunya (1,17). Portanto o diagnóstico laboratorial específico da doença é relevante, visto que permite a confirmação dos casos suspeitos de dengue, sendo essencial para avaliar o prognóstico dos pacientes com precisão, evitando a progressão da doença para manifestações de maior gravidade. Os testes laboratoriais disponíveis para o diagnóstico da dengue são realizados por métodos diretos, que envolvem a detecção do vírus ou antígenos virais e por metodologias indiretas fundamentadas, principalmente, nos ensaios sorológicos para detecção dos biomarcadores da infecção (18).

Os métodos de diagnóstico direto da dengue envolvem o isolamento viral, detecção do genoma e antígenos virais, particularmente, a proteína Não Estrutural 1 (NS1). Esses métodos são utilizados, principalmente, durante a fase aguda da infecção, e são caracterizados pela elevada especificidade. No entanto, apresentam reduzido poder de diagnóstico, visto que são aplicáveis apenas no período de viremia, que dura, aproximadamente, 10 dias após a infecção

(figura 2) (18). A NS1 é secretada no início da infecção e por isso amplamente utilizada como biomarcador, sendo a detecção feita por testes rápidos e ensaios de ELISA (19). O isolamento viral, considerado o teste padrão ouro no diagnóstico da dengue, e a detecção do RNA viral possuem ainda como vantagem a capacidade de identificar o sorotipo do DENV. Mas é importante destacar que essas técnicas possuem limitações, como o curto período de circulação do vírus na corrente sanguínea, o custo elevado, a necessidade de pessoal treinado e infraestrutura laboratorial complexa, por isso a Organização Mundial de Saúde recomenda o uso deles, especialmente, por centros de referência (4,18)



**Figura 2 - A dinâmica da infecção e o diagnóstico da dengue.** O entendimento da evolução clínica da dengue é importante para o planejamento e execução dos testes de diagnóstico da dengue. A dinâmica da infecção envolve a circulação da NS1 e das imunoglobulinas IgM e IgG. Descrição: (A) Representações esquemáticas da evolução das infecções primária e secundária pelo vírus Dengue, em destaque o período de circulação da proteína Não Estrutural 1 (NS1), a viremia e a produção da imunoglobulinas IgM e IgG. A seta e região em destaque (cor preta) demarcam o período para execução dos métodos diretos, as regiões demarcadas em azul correspondem ao período ideal de aplicação dos métodos indiretos de diagnóstico. Adaptado de *Euroimmun* Brasil e disponível em: <<http://www.denguevirus.com.br/>> (acesso em 06/05/2019).

Nesse sentido os métodos indiretos de diagnóstico, baseados na detecção de anticorpos IgG e IgM, aparecem como uma alternativa promissora. Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos, como ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), os testes imunocromatográficos e HI (inibição da hemaglutinação) podem ser utilizados em centros primários de atenção à saúde e/ou centros regionais (2). Esses testes possuem como vantagens o custo mais acessível, a facilidade e rapidez na execução (17). Além disso, os métodos indiretos possuem maior sensibilidade, visto que a detecção de anticorpos é possível desde a fase aguda da infecção (figura 2) (1). Apesar disso, o diagnóstico sorológico da dengue segue sendo

desafiador devido à reatividade cruzada dos anticorpos com outros flavivírus, particularmente o ZIKV, o que compromete a especificidade dos testes comerciais disponíveis (1,18).

A infecção pelo DENV é responsável pelo desenvolvimento de resposta de anticorpos de longa duração que, como descrito previamente, funcionam como biomarcadores de exposição ao vírus (20,21). Durante a infecção os anticorpos IgM aparecem 4 dias após os sintomas iniciais, e ao final da primeira semana de infecção é possível detectar IgG, cujos níveis aumentam ao longo da infecção, sendo observados títulos elevados, principalmente, em infecções secundárias (18). A maioria dos anticorpos são direcionados contra proteínas estruturais (E e prM) e contra a NS1. Além disso, menores níveis de anticorpos já foram detectados contra outras proteínas não estruturais, como a NS3 e a NS5 (20,22,23). Visto que a maioria dos anticorpos são direcionados contra a proteína E, muitos testes sorológicos são fundamentados na presença desse antígeno para detecção de anticorpos e por isso utilizam a proteína E recombinante, partículas virais inativadas e VLPs (*Virus Like Particles*) (21,23). No entanto, sabe-se que os anticorpos contra a proteína E são, predominantemente, direcionados contra o Domínio II dessa proteína (região do *loop* de fusão) que contém epítomos conservados entre os flavivírus (20). Como consequência, muitos dos testes de diagnóstico, baseados na proteína E, apresentam reatividade cruzada entre os flavivírus.

A plataforma de ELISA tem sido tradicionalmente utilizada, desde a década de 80, para detecção de anticorpos ou antígenos do vírus Dengue (17). Os testes de ELISA são de execução simples, baixo custo e possibilitam a avaliação de grande número de amostra (25). No Brasil todos os laboratórios da Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública empregam essa plataforma. Atualmente, o ensaio de ELISA para captura de anticorpos IgM (MAC-ELISA) é amplamente utilizado, sendo inclusive o teste sorológico de escolha para diagnóstico da dengue no Brasil (Ministério da Saúde, 2009). O MAC-ELISA tem como princípio a detecção de anticorpos IgM utilizando antígenos virais de células infectadas pelos DENVs, apresentando sensibilidade e especificidade de 90 e 98 %, respectivamente (2). O Ministério da Saúde do Brasil recomenda também testes sorológicos para detecção de IgG, embora existam apenas 6 testes na plataforma de ELISA registrados na ANVISA com essa finalidade (tabela 1, em destaque).

O diagnóstico de infecções prévias por cada um dos sorotipos do DENV (detecção de IgG) poderia ser de grande impacto na saúde pública, pois permite o monitoramento epidemiológico (incidência e prevalência da doença), identificação dos indivíduos que soroconvertem após vacinação, permitindo também avaliar fatores de risco para doença grave,



pois infecções secundárias pelo DENV podem evoluir para dengue grave (4,18,27). No entanto, os ensaios sorológicos comerciais para diagnóstico da dengue possuem sensibilidade variável e especificidade limitada (28). Além disso, não existem testes sorológicos comerciais para determinação de sorotipos dos DENVs na plataforma de ELISA. O desenvolvimento de novos testes sorológicos que possam efetivamente identificar o sorotipo de DENV com elevado grau de confiabilidade é essencial para que ferramentas inovadoras possam ser empregadas no combate à dengue, permitindo uma melhor avaliação do prognóstico e uma maior acurácia nas intervenções clínicas. Portanto, é essencial desenvolver novos antígenos que permitam o aprimoramento das plataformas atuais de diagnóstico.

Tabela 1: Testes comerciais registrados no Brasil para diagnóstico da dengue<sup>1,4</sup>

TESTE DE DIAGNÓSTICO <sup>2</sup>	PRINCÍPIO DO TESTE <sup>3</sup>
Dengue Duo teste rápido	Teste imunocromatográfico para detecção IgG, IgM e NS1. Contém anticorpo monoclonal capaz de capturar a NS1 e antígeno específico do dengue que é reconhecido pelas imunoglobulinas.
Alere dengue IgG e IgM	Informações não encontradas.
Panbio IgG ELISA	
Alere dengue Duo NS1, IgG e IgM	
Teste rápido OneSite dengue Ag IgG/IgM	Teste imunocromatográfico que utiliza antígenos recombinantes capazes de serem reconhecidos por IgG e IgM do soro teste, e anticorpos monoclonais que capturam a NS1.
Teste rápido OneSite Duo dengue IgG/IgM Combo	Teste imunocromatográfico que utiliza antígenos recombinantes do envelope viral capazes de serem reconhecidos por IgG e IgM.
Platelia Dengue IgG Capture	Teste de ELISA baseado na captura de anticorpos IgG utilizando $\alpha$ -IgG humano, antígeno NS1 e anticorpo monoclonal $\alpha$ -NS1 conjugado à peroxidase.
VISITECT Dengue	Teste imunocromatográfico que utiliza antígenos recombinantes do envelope viral capazes de serem reconhecidos por IgG e IgM.
Novagnost Dengue IgG	Teste de ELISA indireto baseado em antígenos específicos do vírus Dengue para detecção de IgG.
Humanasis teste de anticorpos IgG/IgM Dengue	Informações não encontradas.
Dengue IgG e IgM	Teste imunocromatográfico para captura de IgG e IgM utilizando antígenos do DENV.
Anti-Dengue vírus ELISA IgG Euroimmun	Teste de ELISA para detecção de anticorpos IgG contra partículas do vírus Dengue 2 purificadas.
Dengue IgG/IgM	Informações não encontradas.
Dengue IgG/IgM ECOtest Dengue IgG/IgM Premium	Teste imunocromatográfico para detecção de IgG e IgM que reagem com a proteína E recombinante presente no teste.
ECO Teste ECO F Dengue IgG/IgM	
Teste rápido Dengue IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG e IgM capturados por antígenos específicos do vírus Dengue.
Dengue-EIC IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG e IgM que reconhecem os antígenos recombinantes do envelope viral presente no teste (DEN 1-4).
Dengue IgM/IgG	Teste imunocromatográfico para detecção de IgG e IgM que são reconhecidos por antígenos recombinantes da proteína do Envelope do DENV.
LUMIRATEK DENGUE IgG/IgM - CASSETE	Informações não encontradas.
Dengue IgG/IgM imunocrografia	Teste imunocromatográfico em que os anticorpos IgG e IgM (anti-DENV), reagem com antígenos específicos do vírus Dengue.

Dengue vírus IgG DxSelect	Teste de ELISA para detecção qualitativa de anticorpos IgG utilizando antígenos inativados dos DENVs 1-4.
Teste rápido dengue Ag e Ab Combo	Teste imunocromatográfico para detecção dos anticorpos IgG/IgM e do antígeno NS1.
OL Combo Dengue NS1/IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de antígenos e ou anticorpos contra arbovírus.
OL Dengue IgG/IgM	
OL Combo Chikungunya – Dengue IgG/IgM	
Dengue BIO	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos IgG e IgM específicos a antígenos do vírus Dengue presente no ensaio.
INNOVITA DENGUE IgG/IgM	Informações não encontradas.
Serion ELISA classic Dengue vírus IgG/IgM	ELISA para detecção de anticorpos IgG contra antígenos específicos do DENV.
Smart test anti Dengue IgM/IgG SYM	Informações não encontradas.
Dengue IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos ao dengue que reagem com antígenos recombinantes do envelope viral.
Imuno rápido Dengue IgG/IgM	Teste imunocromatográfico para detecção de anticorpos específicos a antígenos recombinantes do envelope viral.
BioPix DENGUE IgG/IgM	

1- Identificados os testes comerciais para detecção de anticorpos IgG, foram catalogados também os *kits* que detectavam simultaneamente IgG, IgM e NS1.

2- Os produtos foram consultados na Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA), foram catalogados apenas os que estão com registro válido. Data de pesquisa 05/01/2019.

3- Informação disponível nos guias de cada *Kit*, assim como nos *sites* oficiais dos fabricantes/distribuidores.

4- Destaque para os testes que utilizam a plataforma de ELISA.

### 1.3 A PROTEÍNA NS1 E O DIAGNÓSTICO DA DENGUE

A NS1 é uma glicoproteína (~46-50kDa), expressa por todos os flavivírus durante a infecção, encontrando-se nas conformações monomérica, dimérica, e a hexamérica (30). Ainda é incerta a função dessa proteína, porém acredita-se que participe como um arcabouço estrutural no complexo de replicação do genoma viral e esteja relacionada com a evasão da resposta imune do hospedeiro, por bloqueio da ação de proteínas do complemento (31). O principal obstáculo ao uso da NS1 em testes de diagnóstico deve-se ao fato dessa proteína possuir sítios de cisteínas conservados entre os flavivírus, reduzindo a especificidade dos ensaios (30). Os flavivírus compartilham elevada homologia de sequência do gene que codifica a NS1 (29), entre a proteína do ZIKV e dos DENVs 1-4 a homologia varia entre 51 e 53 %. Dentre os sorotipos do DENV essa porcentagem é variável, o maior compartilhamento de informação genética é de 81 % entre os DENVs 1 e 3, já o DENV 4 destaca-se como o mais distante entre os sorotipos, variando de 71-75 % (32). No entanto, fragmentos da proteína possuem homologia de sequência variável entre os sorotipos, tais como a região C-terminal, na qual a homologia varia entre 74-85 % para a NS1 dos DENVs 1-4, portanto de interesse na identificação de novos antígenos alvos no diagnóstico.

A NS1 consiste em um dos principais alvos no diagnóstico da dengue, a detecção desse antígeno por ELISA ou teste imunocromatográfico funciona como uma excelente estratégia de diagnóstico durante a fase aguda da dengue (15). Grupos de pesquisa têm desenvolvido novos ensaios para captura da NS1, fundamentados na utilização de anticorpos monoclonais anti-NS1. Os trabalhos publicados recentemente mostram que essa estratégia permite a diferenciação entre espécies de vírus da família *Flaviviridae*, e até mesmo a identificação de sorotipos do DENV (33). Logo, é sugestivo de que a NS1 possui epítomos específicos ao DENV, assim como a cada um dos sorotipos (34). A NS1 é encontrada em elevadas concentrações na corrente sanguínea, é altamente imunogênica e responsável por promover uma resposta humoral (23,34). Nesse sentido, a detecção de anticorpos (anti-NS1) aparece como estratégia de grande interesse. O Instituto Pasteur de Paris desenvolveu teste de ELISA para detecção de anti-NS1 IgG com a finalidade de avaliar a exposição prévia ao DENV em indivíduos que receberam a vacina desenvolvida no instituto (22). Além disso, grupos têm utilizado também a combinação da NS1 dos DENVs para diagnóstico específico de infecções prévias pelo vírus (22,24). No entanto, a utilização da NS1 inteira nos teste

precisa ser reavaliada diante da reemergência e circulação de outras arboviroses, particularmente o ZIKV.

#### 1.4 IMPORTÂNCIA DO DESENVOLVIMENTO DE NOVAS ESTRATÉGIAS DE DIAGNÓSTICO

É difícil mensurar os custos da dengue à economia mundial, embora se avalie que seja de 8,9 bilhões de dólares com os casos sintomáticos (6). Os investimentos governamentais são direcionados, principalmente, para métodos de controle do vetor, atividades e programas educacionais e cuidados hospitalares (7). O desenvolvimento de estratégias de diagnóstico é visto como prioridade pela comunidade científica. Essa emergência está relacionada à atual situação epidemiológica dos países em regiões tropicais, onde há circulação do DENV com outros flavivírus como o ZIKV e o YFV, comprometendo fortemente a especificidade dos testes de diagnóstico disponíveis. Devido a atual situação epidemiológica dos países em regiões tropicais, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) tem recomendado o desenvolvimento de novos procedimentos para o diagnóstico dessas arboviroses (2).

Nessa direção, o Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas identificou e produziu um novo antígeno recombinante baseado na proteína NS1 do ZIKV ( $\Delta$ NS1 ZIKV), para o diagnóstico específico de infecções prévias pelo vírus Zika. A identificação do antígeno permitiu a obtenção de pedido de proteção intelectual ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (BR102016011318-0) e a validação do teste de diagnóstico sorológico em parceria com laboratórios do Instituto de Ciências Biomédicas da USP e do Instituto Butantan. Nesta nova proposta, a obtenção dos segmentos derivados das proteínas NS1 dos DENVs 1-4, e que correspondem aos fragmentos homólogos à NS1 ZIKV descrito anteriormente, abrem perspectivas para o estabelecimento do diagnóstico específico da dengue e adequada sorotipagem.

Nos últimos anos tem-se investido em diferentes métodos como os biossensores e alternativas empregando nanotecnologia (17). Mas é preciso investir também em plataformas tradicionais como os testes de ELISA, amplamente validados e aceitos por laboratórios de saúde pública. Além disso, é indispensável identificar novos antígenos que promovam melhores valores de sensibilidade e especificidade. Nesse sentido, a presente proposta apresenta-se de forma inovadora e contribui para o desenvolvimento de estratégias de testes sorológicos, ao investigar o uso de novos antígenos recombinantes para o diagnóstico da dengue.

## 2 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos após execução do projeto permitem estabelecer as seguintes conclusões:

- 1) As proteínas recombinantes  $\Delta$ NS1 dos DENVs foram expressas em sistema procarioto, sendo obtidas em sua forma solúvel, com elevado grau de pureza e rendimento considerável após as etapas de purificação;
- 2) As proteínas  $\Delta$ NS1 foram reconhecidas por soros de animais infectados pelos DENVs, confirmando a antigenicidade dessas proteínas. Além disso, anticorpos anti- $\Delta$ NS1 do DENV4 foram capazes de reconhecer a NS1 em células Vero infectadas, demonstrando a semelhança entre os antígenos recombinante e as correspondentes proteínas nativas;
- 3) A combinação das proteínas recombinantes em ensaio de ELISA permitiu identificar de forma específica e sensível infecções prévias pelos quatro sorotipos do DENV sem a interferência de anticorpos produzidos após infecção pelo ZIKV;
- 4) As proteínas  $\Delta$ NS1 dos DENVs 1, 2 e 4 apresentaram maior especificidade em relação ao reconhecimento pelo sorotipo homólogo.

Esses resultados comprovam a utilidade de novos antígenos recombinantes com elevado potencial para o diagnóstico específico da dengue, inclusive com a diferenciação entre os sorotipos. Desta forma, abrem-se perspectivas para o desenvolvimento de ensaios sorológicos diferenciais, acessíveis e de relevante impacto aos serviços de saúde pública.

**REFERENCIAS\***

1. Simmons CP, Farrar JJ, van Vinh Chau N, Wills B. Dengue. *N Engl J Med* [Internet]. Massachusetts Medical Society ; 2012 Apr 12 [cited 2018 Jan 4];366(15):1423–32. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1110265>
2. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Dec 1 [cited 2018 Jan 3];8(12):S7–16. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nrmicro2460>
3. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and flavivirus vaccines. *Vaccine* [Internet]. 2012 Jun 19 [cited 2019 Apr 26];30(29):4301–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682286>
4. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2016 Aug 18 [cited 2019 Apr 26];2:16055. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27534439>
5. Organization WH. Dengue : Guidelines for Diagnosis Treatment Prevention and Control (New Edition 2009). [Internet]. World Health Organization; 2009 [cited 2019 Apr 26]. 158 p. Available from: [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=dlc0YSIyGYwC&oi=fnd&pg=PP2&dq=dengue+guidelines+WHO+2009&ots=ONyXGE3Nn6&sig=AVI1yz19j3gMadK0zEG\\_XTi6Pnk#v=onepage&q=dengue+guidelines+WHO+2009&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=dlc0YSIyGYwC&oi=fnd&pg=PP2&dq=dengue+guidelines+WHO+2009&ots=ONyXGE3Nn6&sig=AVI1yz19j3gMadK0zEG_XTi6Pnk#v=onepage&q=dengue+guidelines+WHO+2009&f=false)
6. Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clin Epidemiol* [Internet]. Dove Press; 2013 [cited 2018 Jan 3];5:299–309. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23990732>
7. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013 Apr 7 [cited 2018 Jan 3];496(7446):504–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nature12060>
8. Epidemiológico B, Editorial Wanderson Kleber de Oliveira C, Buosi Rohlfs D, Marques Macário E, Duarte E, Fernando Mendes Pereira G, et al. Apresentação. [cited 2019 Apr 26]; Available from: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/21/2019-006.pdf>
9. Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier; 2017 Mar 1 [cited 2018 Jan 19];17(3):e88–100. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330991630473X>
10. Melino S, Paci M. Progress for dengue virus diseases. *FEBS J* [Internet]. Blackwell Publishing Ltd; 2007 Jun 1 [cited 2018 Jan 5];274(12):2986–3002. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2007.05831.x>
11. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 Apr 18 [cited 2018 Jan 6];23(5):456–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nsmb.3213>

12. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier; 2003 May 1 [cited 2018 Jan 7];3(1):19–28. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134803000042>
13. OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborío S, et al. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med* [Internet]. American Association for the Advancement of Science; 2011 Dec 21 [cited 2018 Jan 7];3(114):114ra128. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22190239>
14. Diamond MS, Pierson TC. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* [Internet]. Cell Press; 2015 Jul 30 [cited 2018 Jan 8];162(3):488–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867415008429>
15. Muller DA, Depelseñaire ACI, Young PR. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Infect Dis* [Internet]. Oxford University Press; 2017 Mar 1 [cited 2018 Jan 8];215(suppl\_2):S89–95. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/jiw649>
16. Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2005 Jan 1 [cited 2018 Jan 7];3(1):13–22. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1067>
17. Zhang B, Salieb-Beugelaar GB, Nigo MM, Weidmann M, Hunziker P. Diagnosing dengue virus infection: rapid tests and the role of micro/nanotechnologies. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 Apr 26];11(7):1745–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26093055>
18. Peeling RW, Artsob H, Pelegrino JL, Buchy P, Cardoso MJ, Devi S, et al. Evaluation of diagnostic tests: dengue. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2018 Jan 20];8(12):S30–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro2459>
19. dos Santos FB, Miagostovich MP, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Riley LW, Harris E. Analysis of recombinant dengue virus polypeptides for dengue diagnosis and evaluation of the humoral immune response. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2004 Aug [cited 2019 May 1];71(2):144–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306702>
20. Wahala WMPB, de Silva AM. The Human Antibody Response to Dengue Virus Infection. *Viruses* [Internet]. 2011 Nov 25 [cited 2019 Feb 25];3(12):2374–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22355444>
21. Cedillo-Barrón L, García-Cordero J, Bustos-Arriaga J, León-Juárez M, Gutiérrez-Castañeda B. Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect* [Internet]. Elsevier Masson; 2014 Sep 1 [cited 2019 Feb 25];16(9):711–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457914000987>
22. Nascimento EJM, George JK, Velasco M, Bonaparte MI, Zheng L, DiazGranados CA, et al. Development of an anti-dengue NS1 IgG ELISA to evaluate exposure to dengue virus. *J Virol Methods* [Internet]. 2018 Jul [cited 2019 Apr 26];257:48–57. Available



- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29567514>
23. Cedillo-Barrón L, García-Cordero J, Bustos-Arriaga J, León-Juárez M, Gutiérrez-Castañeda B. Antibody response to dengue virus. *Microbes Infect* [Internet]. 2014 Sep [cited 2019 Apr 26];16(9):711–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25124542>
  24. Tyson J, Tsai W-Y, Tsai J-J, Brites C, Mässgård L, Ha Youn H, et al. Combination of Nonstructural Protein 1-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Can Detect and Distinguish Various Dengue Virus and Zika Virus Infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology Journals; 2019 Feb 1 [cited 2019 Apr 26];57(2):e01464-18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30429254>
  25. Mardekian SK, Roberts AL. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *Biomed Res Int* [Internet]. Hindawi; 2015 Oct 5 [cited 2019 Apr 27];2015:1–8. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/834371/>
  26. Normas SA, Técnicos M. Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue [Internet]. 2009 [cited 2019 Apr 26]. Available from: <http://www.saude.gov.br/bvs>
  27. Katzelnick LC, Coloma J, Harris E. Dengue: knowledge gaps, unmet needs, and research priorities. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2017 Mar [cited 2019 Apr 26];17(3):e88–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28185868>
  28. Rodriguez-Manzano J, Po &, Chia Y, Tsin &, Yeo W, Holmes A, et al. Improving Dengue Diagnostics and Management Through Innovative Technology. 1908 [cited 2019 Apr 27]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11908-018-0633-x>
  29. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res* [Internet]. Elsevier; 2013 May 1 [cited 2018 Feb 18];98(2):192–208. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354213000624>
  30. Das D, Mongkolaungkoon S, Suresh MR. Super induction of dengue virus NS1 protein in *E. coli*. *Protein Expr Purif* [Internet]. Academic Press; 2009 Jul 1 [cited 2018 Feb 13];66(1):66–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592809000333>
  31. Muller DA, Landsberg MJ, Bletchly C, Rothnagel R, Waddington L, Hankamer B, et al. Structure of the dengue virus glycoprotein non-structural protein 1 by electron microscopy and single-particle analysis. *J Gen Virol* [Internet]. 2012 Apr 1 [cited 2018 Jun 6];93(Pt\_4):771–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238236>
  32. Balmaseda A, Stettler K, Medialdea-Carrera R, Collado D, Jin X, Zambrana JV, et al. Antibody-based assay discriminates Zika virus infection from other flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. National Academy of Sciences; 2017 Aug 1 [cited 2018 May 6];114(31):8384–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28716913>
  33. Röltgen K, Rose N, Ruggieri A, Warryn L, Scherr N, Pinho-Nascimento CA, et al. Development of Dengue Virus Serotype-Specific NS1 Capture Assays for the Rapid and Highly Sensitive Identification of the Infecting Serotype in Human Sera. *J Immunol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 Apr 27];200(11):3857–66. Available from:

- <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1701790>
34. Wattal C, Datta S. Dengue NS1 antigen detection: A useful tool in early diagnosis of dengue virus infection. *Indian J Med Microbiol* [Internet]. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd.; 2010 [cited 2019 Apr 27];28(2):107. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404453>
  35. Castro MC, Wilson ME, Bloom DE. Disease and economic burdens of dengue. *Lancet Infect Dis* [Internet]. Elsevier; 2017 Mar 1 [cited 2018 Jan 6];17(3):e70–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147330991630545X>
  36. Suaya J, Shepard D, Beatty M. Dengue burden of disease and cost of illness. WHO Scientific Working Group: Report on Dengue Vol. 2007 [cited 2019 Apr 27]; Available from: [https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as\\_sdt=0%2C5&q=Dengue+burden+of+disease+and+cost+of+illness.+WHO+Scientific+Working+Group%3A+Report+on+Dengue+Vol&btnG=](https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Dengue+burden+of+disease+and+cost+of+illness.+WHO+Scientific+Working+Group%3A+Report+on+Dengue+Vol&btnG=)
  37. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* [Internet]. 1986 Sep 23 [cited 2019 Apr 26];25(19):5425–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2430611>
  38. Ansari H, Raghava GP. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome Res* [Internet]. 2010 Oct 20 [cited 2019 Apr 26];6(1):6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961417>
  39. Amorim JH, Porchia BFMM, Balan A, Cavalcante RCM, da Costa SM, de Barcelos Alves AM, et al. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. *J Virol Methods* [Internet]. Elsevier; 2010 Aug 1 [cited 2017 Dec 24];167(2):186–92. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093410001321>
  40. Cunha M dos P, Guimarães VN, Souza M, de Paula Cardoso D das D, de Almeida TNV, de Oliveira TS, et al. Phylodynamics of DENV-1 reveals the spatiotemporal co-circulation of two distinct lineages in 2013 and multiple introductions of dengue virus in Goiás, Brazil. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2016 Sep [cited 2019 Apr 26];43:130–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27223633>
  41. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam A V. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 1992 [cited 2019 Apr 26];30(3):545. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265106/>
  42. Dutra NR, de Paula MB, de Oliveira MD, de Oliveira LL, De Paula SO. The laboratorial diagnosis of dengue: applications and implications. *J Glob Infect Dis* [Internet]. Wolters Kluwer -- Medknow Publications; 2009 Jan [cited 2019 Apr 29];1(1):38–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20300385>
  43. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier; 2009 May 1 [cited 2018 May 29];27(3):297–306. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000202>

44. Desai PN, Shrivastava N, Padh H. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnol Adv* [Internet]. Elsevier; 2010 Jul 1 [cited 2018 May 29];28(4):427–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975010000194>
45. Renaud Vincentelli, Christophe Bignon \*, Arnaud Gruez, Stephane Canaan, Gerlind Sulzenbacher, Mariella Tegoni, et al. Medium-Scale Structural Genomics: Strategies for Protein Expression and Crystallization. *American Chemical Society* ; 2003 [cited 2018 May 29]; Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ar010130s>
46. Allonso D, da Silva Rosa M, Coelho DR, da Costa SM, Nogueira RMR, Bozza FA, et al. Polyclonal antibodies against properly folded Dengue virus NS1 protein expressed in *E. coli* enable sensitive and early dengue diagnosis. *J Virol Methods* [Internet]. Elsevier; 2011 Jul 1 [cited 2018 Jun 1];175(1):109–16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166093411001674>
47. Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm* [Internet]. Elsevier; 2005 Jan 31 [cited 2018 Jun 1];289(1–2):1–30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517304006908>
48. Chen Y, Pan Y, Guo Y, Qiu L, Ding X, Che X. Comprehensive mapping of immunodominant and conserved serotype- and group-specific B-cell epitopes of nonstructural protein 1 from dengue virus type 1. *Virology* [Internet]. 2010 Mar 15 [cited 2018 Jun 3];398(2):290–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20079511>
49. Hertz T, Beatty PR, MacMillen Z, Killingbeck SS, Wang C, Harris E. Antibody Epitopes Identified in Critical Regions of Dengue Virus Nonstructural 1 Protein in Mouse Vaccination and Natural Human Infections. *J Immunol* [Internet]. 2017 May 15 [cited 2018 Jun 3];198(10):4025–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381638>
50. Freire MCLC, Pol-Fachin L, Coêlho DF, Viana IFT, Magalhães T, Cordeiro MT, et al. Mapping Putative B-Cell Zika Virus NS1 Epitopes Provides Molecular Basis for Anti-NS1 Antibody Discrimination between Zika and Dengue Viruses. *ACS Omega* [Internet]. American Chemical Society; 2017 Jul 31 [cited 2018 Jun 3];2(7):3913–20. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.7b00608>
51. SUMITA LM, RODRIGUES JP, FERREIRA NE, FELIX AC, SOUZA NCS, MACHADO CM, et al. DETECTION OF HUMAN ANTI-ZIKA VIRUS IgG BY ELISA USING AN ANTIGEN FROM *in vitro* INFECTED VERO CELLS: PRELIMINARY RESULTS. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2016 [cited 2019 Apr 30];58(0). Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-46652016005000270&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652016005000270&lng=en&tlng=en)
52. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2016 May 18 [cited 2018 Jun 6];23(5):456–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nsmb.3213>
53. Shu P-Y, Huang J-H. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol* [Internet]. American Society for Microbiology; 2004 Jul 1 [cited 2019 Apr 30];11(4):642–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15242935>

54. Rai R, Dubey S, Santosh KV, Biswas A, Mehrotra V, Rao DN. Design and synthesis of multiple antigenic peptides and their application for dengue diagnosis. *Biologicals* [Internet]. Academic Press; 2017 Sep 1 [cited 2019 May 1];49:81–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1045105617301008>