Padronização de um ELISA do tipo sandwich para captura do NS1 do Vírus Zika

Nikolas Alexander Borsato Lino, Paula Rahal, Vivaldo Gomes da Costa, Marília de Freitas Calmon, Cintia Bittar Oliva, Roxane Maria Fontes Piazza. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP/IBILCE, Bacharelado em Ciências Biológicas, nikolas.alexander@unesp.br, p.rahal@unesp.br, Bolsa PIBIC - CNPq

Palavras Chave: *vírus Zika; ELISA sandwich; diagnóstico NS1*

Introdução

O vírus Zika (ZIKV), família *Flaviviridae*, foi associado com o incomum aumento de casos de microcefalia no Brasil[1]. Tendo em conta a ausência de tratamento antiviral específico e vacina para febre do Zika, a forma mais efetiva de diminuir a transmissão é diagnosticar a doença[2,3]. Nesse sentido, os principais ensaios laboratoriais disponíveis estão voltados à detecção de IgM e IgG anti-ZIKV. Esses biomarcadores dificultam o diagnóstico precoce devido ao período de janela imunológica e, frequentemente, mostram problemas de reatividade cruzada com outros flavivírus[4,5]. Em contraste, o presente teste está utilizando NS1, sendo inovador por permitir a captura do antígeno nos primeiros dias da doença, o que possibilita um diagnóstico precoce.

Objetivo

Padronizar um teste de ***e**nzyme **l**inked **i**mmuno**s**orbent **a**ssay* (ELISA) visando à captura do NS1 do ZIKV em amostras biológicas, urina e soro, sabidamente positivas e negativas para o ZIKV.

Material e Métodos

O anticorpo teste, IgG policlonal anti-NS1 do ZIKV, foi cedido mediante colaboração com o Instituto Butantan.

Quanto à padronização do ELISA *sandwich*, titulações em bloco foram realizadas para determinar as concentrações ideais de trabalho do anticorpo de sensibilização, do bloqueio, do anticorpo monoclonal anti-NS1, do IgG anti-camundongo HRP e dos controles negativos (C-) e positivos (C+) para ZIKV. Todos os experimentos foram conduzidos em microplacas de ELISA e os resultados, medidos em densidade óptica (DO) por um espectrofotômetro (FLUOstar Omega) com comprimento de onda de 450nm.

Resultados e Discussão

Mediante as etapas de padronização, observou-se que o melhor bloqueio foi a caseína a 0,5%, a qual gerou menor reação inespecífica (DO<0,2). Também se notou que a melhor concentração do anticorpo de captura foi de 4,2 µg/mL, enquanto optamos por utilizar 2,5 µg/mL do anticorpo monoclonal anti-NS1.

Inicialmente, com a testagem de NS1 do dengue, reatividade cruzada não foi observada, tendo em vista que a sua absorbância foi similar ao branco (DO=0,2).

Para os C+ (NS1 de ZIKV purificado) foram encontrados valores de elevada DO, variando entre 1,29 (diluição 1/12800) e 1,824 (diluição 1/400). Já para os C- a absorbância foi extremamente baixa, (0,064<DO<0,091). Dessa forma, os C+ têm reagido satisfatoriamente com o anticorpo de captura e tem gerado DO superior 1,1, enquanto os C- não tem gerado reações inespecíficas. Os resultados são promissores e estimula o prosseguimento para a próxima etapa do estudo, a qual envolverá a triagem de mais amostras biológicas confirmadas com ZIKV.

Conclusão

Nesse estudo piloto, conclui-se que a caseína a 0,5% acrescida do anticorpo policlonal (anti-NS1) na concentração de 4,2 µg/ml tem fornecido menor reação inespecífica. Dessa forma, satisfatoriamente o nosso anticorpo teste tem se mostrado promissor no diagnóstico do NS1 do ZIKV.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo apoio financeiro e ao Butantan (Dra Roxane M.F. Piazza) pela colaboração.

1. YAKOB, Laith. Zika Virus after the Public Health Emergency of International Concern Period, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 28, n. 4, p. 837-840, abr. 2022. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). doi:10.3201/eid2804.211949.

2. PAHO - Pan American Health Organization. Epidemiological Update: Zika virus infection. Washington, D.C. out. 2015. https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/2015-oct-16-cha-zika-virus-epi-update.pdf

3. PERGOLIZZI, Joseph; et al. The Zika virus: lurking behind the covid **:**19 pandemic?. **J Clin Pharm Therap**, v. 46, n. 2, p. 267-276, 20 nov. 2020. Wiley. doi: 10.1111/jcpt.13310.

4. MACIEJEWSKI, Sonia; PIERSON, Theodore C. Cross-Reactive Flavivirus Antibody: friend and foe **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 5, p. 622-624, nov. 2018. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.chom.2018.10.016.

5. SILVA, Isaura Beatriz Borges; et al. Zika virus serological diagnosis: commercial tests and monoclonal antibodies as tools. **J Venomous Anim Toxins Includ Trop Dis**, p. 1-12, 2020. doi:10.1590 /1678-9199-jvatitd-2020-0019.