12º Encontro Anual de Iniciação Tecnológica e Inovação

DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA DENGUE BASEADO EM EPÍTOPOS DE SUPERFÍCIE

Ana Julia Soldera Barradas (PIBITI/CNPq/UEM), Fernanda Leghi Garcia, Rafaella Daleffe Pepino, Amauri Donadon Leal Junior, Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça, Érika Seki Kioshima Cotica (Orientador), e-mail: eskcotica@uem.br

Universidade Estadual de Maringá (UEM)/Departamento de Análises Clínicas (CCS-DAB).

Área e subárea do conhecimento: Biotecnologia.

Palavras-Chave: *biotecnologia, proteína recombinante, imunoensaio.*

Introdução

O Brasil tem sofrido, nos últimos anos, com um aumento exponencial dos casos de Dengue, sendo este um problema de saúde pública. No Paraná, no último ciclo epidemiológico, foram notificados mais de 115 mil casos e mais de 70 mortes pela doença. A dengue é uma doença febril aguda desencadeada pela infecção pelo vírus da Dengue (DENV). Geralmente, é uma doença autolimitada, surgindo entre 3 a 10 dias após a picada pelo mosquito. Inicialmente, na infecção, os sintomas costumam ser semelhantes aos da gripe, Chikungunya e Zika. A co-circulação dos arbovírus agrava este cenário, já que a sobreposição dos sintomas pode levar a equívocos no diagnóstico clínico e problemas em pesquisas de soroprevalência. Assim, o diagnóstico diferencial das infecções causados por arbovírus tem sido um desafio.

Problema

Apesar da necessidade de um rápido e correto diagnóstico diante do cenário apresentado, não existe no mercado um kit sorológico capaz distinguir as infecções causadas pelos principais arbovírus: da Dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV) e Zika (ZIKV) com baixa reatividade cruzada. Assim, esse projeto teve o objtivo principal produzir um antígeno recombinante específico para vírus Dengue, baseado nas proteínas de superfície (de envelope e membrana) com foco no diagnóstico sorológico diferencial.

Solução e Benefícios

Expressão e purificação das proteínas químericas específicas para três sorotipos de DENV: sorotipo 2 (DENV2), sorotipo 3 (DENV3) e sorotipo 4 (DENV4), que poderá auxiliar no diagnóstico sorológico diferencial, foi realizada em meio LB, 37ºC, 6 h com 1mM IPTG.

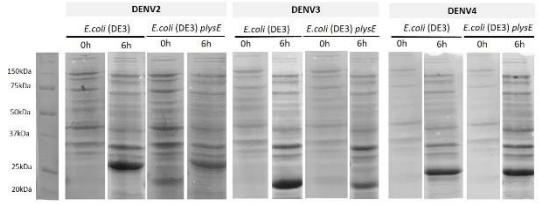


Figura 1. Análise da expressão das proteínas quiméricas (DENV2, DENV3 e DENV4) em gel de SDS-PAGE 12%. A indução foi realizada em duas linhasgens de *E. coli* (BL21 (DE3) e BL21 (DE3) *plysE*) em meio LB a 37°C, 1 mM (IPTG). Após 6h de indução é possível observar a presença das proteinas DENV2 (~25kDa), DENV3 (~20kDa) e DENV4 (~23kDa).

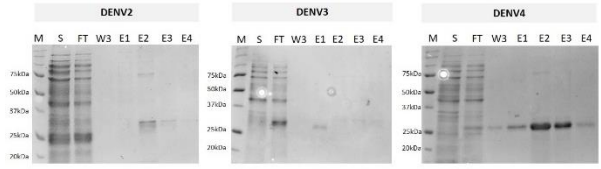


Figura 2. Análise em SDS-PAGE da purificação de DENV2, DENV3 e DENV4. DENV4 foi realizada a purificação na condição não-desnaturante. Já para DENV2 e DENV3 a condição desnaturante (Ureia, 8M). M: marcador de peso molecular (Biorad); S: Sobrenadante; FT: Flow Through; W3: lavagem 3: E1 a E4 – eluições (DENV2 (~25kDa), DENV3 (~20kDa) e DENV4 (~23kDa).

As quimeras purificadas foram utilizadas no imunoensaio preliminar para avaliar a especificidade dos antígenos frente ao soro de pacientes acometidos por diferentes arboviroses.

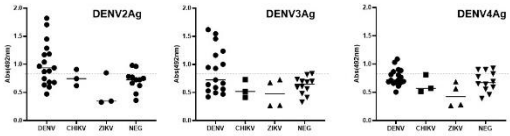


Figura 3. IgG ELISA com as quimeras (DENV2Ag, DENV3Ag e DENV4Ag) avaliado com soro de paciente com resultado prévio positivo para dengue (DENV), Chikungunya (CHIKV), zika (ZIKV) e pacientes negativos para dengue (NEG).

Potencial de Mercado e Diferencial Competitivo

O projeto possui amplo potencial de mercado não somente nacional como internacional. Desta forma, foi possível a obtenção das proteínas recombinantes específicas (quimeras) para seguir o ensaio imunológico, que ainda que preliminar, apresenta resultados promissores, a fim de desenvolver um kit diagnóstico sorológico.

Considerações Finais

Considerando que muitas regiões se encontram em situação de epidemia, o desenvolvimento de um insumo biotecnológico poderá contribuir com o correto e rápido diagnóstico desta arbovirose.

Estágio de Desenvolvimento da Tecnologia

(X) Laboratório ( ) Mercado
( ) *Scale-up* (mudança de escala) ( ) Protótipo

Agradecimentos

CNPq pelo apoio e financiamento

Contato Institucional

Ana Julia Soldera Barradas (ra115963@uem.br)
Universidade Estadual de Maringá (UEM)/CCS-DAB;
(44) 98828-3521.