

Samuel Santos Pereira

**Desenvolvimento e avaliação de imunobiológicos
para o diagnóstico sorológico de arboviroses**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão original

São Paulo
2023

RESUMO

PEREIRA, S. S. **Desenvolvimento e avaliação de imunobiológicos para o diagnóstico sorológico de arboviroses**. Tese (Programa de Pós-graduação em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2023.

O vírus Dengue pertence à família *Flaviviridae* sendo de relevante impacto na saúde pública mundial. O diagnóstico laboratorial é uma importante ferramenta para a identificação específica dos casos de dengue. Os testes sorológicos para detecção de anticorpos IgM e IgG são amplamente utilizados no diagnóstico laboratorial da dengue. No entanto, devido à elevada semelhança antigênica entre os *Flavivírus*, há forte comprometimento da especificidade dos testes sorológicos comerciais. Além disso, a re-emergência de alguns *Flavivírus*, como o vírus Zika, torna o diagnóstico laboratorial desafiador. O objetivo desse trabalho foi avaliar imunobiológicos recombinantes derivados das proteínas Não Estrutural 1 (NS1) e do Envelope (E) dos DENVs 1-4 para o diagnóstico sorológico de infecções prévias pelos DENVs. Os antígenos recombinantes Δ NS1 e EDIII foram construídos a partir das proteínas NS1 e E dos DENVs 1-4. Esses antígenos foram expressos em *Escherichia coli* e purificados por cromatografia. A antigenicidade foi confirmada por ELISA com soros anti-DENV, demonstrando que as proteínas obtidas preservam epítomos semelhantes aos das proteínas nativas. Inicialmente, avaliamos a combinação das proteínas Δ NS1 DENVs para diagnóstico da dengue na plataforma de ELISA. Os resultados dos testes indicaram sensibilidade de 79-82% e especificidade de 79-93%. Desenvolvemos também um antígeno poliepítopo baseado na fusão das Δ NS1 dos quatro tipos de DENV e denominado de T- Δ NS1. Essa proteína foi expressa, purificada e reconhecida por soros anti-DENV. A performance da T- Δ NS1 em ensaio de ELISA determinou sensibilidade de 77,42% e especificidade de 88,57%. Ao final, investigamos o uso da combinação das proteínas EDIII DENVs 1-4 em ensaio de ELISA. A performance do ensaio indicou sensibilidade de 88% e especificidade de 91%. As EDIII foram utilizadas também em plataforma de diagnóstico *multiplex*, e a prova de conceito inicial indicou que elas podem ser aplicadas nessa plataforma de diagnóstico. As Δ NS1 e EDIII DENVs 1-4 foram avaliadas também para diferenciação dos sorotipos. Em análise com amostras de soro de animais infectados observamos maior reatividade da proteína com o soro anti-DENV homólogo, particularmente as proteínas EDIII. Os resultados obtidos com as amostras de soro humano permitiram diferenciar respostas anti-DENV 1 de outros sorotipos com as proteínas EDIII, confirmando a aplicabilidade dessas proteínas para diferenciação de infecção com os diferentes tipos de DENVs. Em conjunto, os resultados obtidos nesse estudo confirmam que os antígenos recombinantes podem ser utilizados como imunobiológicos em testes de diagnóstico da dengue, combinando sensibilidade e especificidade. Os resultados contribuem para a produção de conhecimento científico na área, mas também, abrem perspectivas de desenvolvimento dos novos imunobiológicos para de *kits* de diagnóstico sorológico para a dengue.

Palavras-chave: Dengue. Diagnóstico sorológico. Proteína Não Estrutural 1 (NS1). Domínio III (EDIII).

ABSTRACT

PEREIRA, S. S. **Development and evaluation of immunobiologicals for the serological diagnosis of arboviruses.** Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2023.

The Dengue virus belongs to *Flaviviridae* family and has a relevant impact in global public health. Laboratory diagnosis is an important tool for the specific identification of dengue cases. Serological tests to detect IgM and IgG antibodies are widely used in the laboratory diagnosis of dengue. However, due to the high antigenic similarity between *Flaviviruses*, the specificity of dengue commercial tests is strongly compromised. Furthermore, the re-emergence of some *Flaviviruses*, such as Zika virus, makes the laboratory diagnosis challenging. The goal of this study was to evaluate recombinant immunobiologicals derived from the Non-structural protein 1 (NS1) and Envelope protein (E) of DENVs 1-4 for the serological diagnosis of previous dengue infections. The recombinant Δ NS1 and EDIII antigens were constructed based on the NS1 and Envelope proteins of DENVs 1-4. These antigens were expressed in *Escherichia coli* and purified by affinity chromatography. Antigenicity was confirmed by ELISA using anti-DENVs sera and indicated that the recombinant proteins maintained epitopes similar to the native proteins. Initially, we evaluated the combination of DENVs 1-4 Δ NS1 proteins for diagnosing dengue on the ELISA test. The results indicated 79-82% sensitivity and 79-93% specificity. We also developed a multi-epitope antigen based on the Δ NS1 derived from the four DENV types and called T- Δ NS1. This protein was expressed, purified and recognized by anti-DENVs sera. The performance of the T- Δ NS1-based ELISA achieved 77,42% sensitivity and 88,57% specificity. Finally, we investigated the combination of DENVs 1-4 EDIII proteins in the ELISA test. The performance indicated 88% sensitivity and 91% specificity. EDIII proteins were also used in a multiplex diagnostic platform, and the preliminary proof of concept indicated that the antigens can be applied to this diagnostic platform. The DENVs 1-4 Δ NS1 and EDIII were also evaluated for serotype differentiation. The analyses with serum from infected mice demonstrated that each recombinant protein had greater reactivity with the homologous anti-DENV serum, particularly the EDIII proteins. So far, the results with human serum samples showed that it was possible to differentiate anti-DENV 1 responses from other DENV types with the recombinant EDIII proteins, which confirmed the applicability of these proteins to differentiate infection with the different DENVs serotypes. Taken together, the results obtained in this study ratify that the recombinant protein fragments can be used as immunobiologicals in dengue diagnostic tests, combining adequate sensitivity and specificity. The results contribute to the production of scientific knowledge in the area of the study, but also open up perspectives for the development of new immunobiologicals for serological diagnostic kits for dengue.

Keywords: Dengue. Serological diagnosis. Non-structural protein 1 (NS1). Domain III (EDIII).