

REA.10 - Padronização da microplataforma automatizada e de alto desempenho para análise de soroneutralização do vírus Zika baseada em apoptose (micro CRNT)

Amanda Torrentes de Carvalho^{1*}; Stephanie Almeida da Silva²; Emily Hime Miranda²; Pedro Paulo de Abreu Manso³; Sheila Maria Barbosa de Lima²; Zilton Farias Meira de Vasconcelos¹.

1Fiocruz/IFF;

2Fiocruz/Bio-Manguinhos;

3Fiocruz/IOC.

Introdução:

O teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT) é empregado na quantificação de anticorpos neutralizantes e apresenta, frente a outros testes virológicos, maior especificidade. Entretanto o mesmo é laborioso e demanda tempo. O PRNT adotado no laboratório utiliza placa de 24 poços para o vírus Zika (ZIKV), o que limita a análise simultânea de um número elevado de amostras. Além disso, a quantificação dos títulos de anticorpos é feita pela contagem manual de “placas”, estando sujeita a variações intra e inter-operador. Como o ZIKV regularmente causa efeitos citopáticos e consequente morte de células altamente permissivas à infecção, nos perguntamos se eventos iniciais desta propriedade viral poderiam ser utilizados para otimizar o ensaio.

Objetivo:

Desenvolver uma plataforma de ensaio biológico automatizado e com alto desempenho baseada nos princípios do PRNT ZIKV utilizando microplaca e cuja quantificação do bloqueio da infecção pelos anticorpos seja dada através da detecção de fluorescência emitida por um substrato permeável à membrana celular, projetado para detectar apoptose.

Metodologia:

Para avaliar se seria viável a contagem automatizada de células no nosso ensaio, utilizamos o PRNT Febre Amarela (FA), já padronizado pelo LATEV, que também é feito em microplaca. Neste ensaio a contagem é feita manualmente via operador com utilização do Biospot. Portanto, comparamos as duas formas de contagem. O coeficiente de correlação (r^2) descreveu a linha em que melhor se

dispõem os dados comparativos e a correlação entre os tipos de contagem para PRNT FA foram feitas através do teste de Spearman. Para a padronização do micro CRNT, estabelecemos a concentração celular e os controles apoptóticos (Brefeldina A) e necróticos (Triton X), utilizando marcação para DAPI e Iodo de propídeo através de imagens por microscopia de fluorescência.

Resultado:

A comparação estatística dos títulos de anticorpos para PRNT FA usando corte de 90 indivíduos demonstrou correlação direta entre os valores obtidos pela contagem automatizada, em comparação à contagem manual feita pelo operador 1 (0,9394) e operador 2 (0,9451). Também observamos boa correlação entre os dois métodos de contagem, tanto inter-operadores (0,9830) quanto entre estes e o método automatizado (Op1 0,9204; Op2 0,9290). Para estabelecimento da concentração e quantificação celular do micro CRNT e respectivos controles de morte celular, utilizamos rastreamento de núcleos individualizados de células vero cultivadas por 48 horas e padronizamos a cinética ideal para apoptose (48 horas pós tratamento) e necrose (24 horas pós tratamento).

Conclusão:

Estabelecemos uma plataforma de ensaio biológico com células vero em microplaca para análise da viabilidade celular. Além disso, a comparação da acurácia da contagem automatizada de PRNT em placa de 96 poços demonstra uma boa equivalência além de uma rápida análise em comparação ao método manual podendo, futuramente, ser utilizado como abordagem analítica para o PRNT ZIKV e o micro CRNT.

Palavras-chave: Microplataforma automatizada; Soroneutralização; Apoptose