

OTR.I2 - Padronização de teste de neutralização por redução de focos (FRNT) para Zika como alternativa ao teste padrão-ouro PRNT

José Henrique Rezende Linhares^{1*}; Vanessa de Oliveira Santos¹; Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville¹; Ana Cláudia Machado Duarte¹; Patrícia Brasil²; Stephanie Almeida da Silva¹; Marta Cristina de Oliveira Souza¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹.

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2Fiocruz/IOC.

Introdução:

A Zika é causada por um arbovírus (ZIKV) pertencente à família *Flaviviridae*, transmitido principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* em regiões tropicais causando um surto no Brasil em 2015 com infecções predominantemente assintomáticas. Apesar das infecções sintomáticas geralmente serem brandas, sua associação à síndrome de Guillain-Barré e microcefalia em neonatos tornou-a emergência de saúde pública. O desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas são essenciais para controle da zika. Dentre os testes sorológicos, o PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*) é crucial para avaliação de eficácia vacinal, posto que é considerado padrão-ouro para detecção de anticorpos neutralizantes (nAbs), correlacionados à proteção para outros flavivírus (Dengue e Febre Amarela). Contudo, sendo laborioso e de limitada capacidade de análise, é necessário desenvolver ensaios de menor tempo de execução, maior capacidade de análise de amostras e alta sensibilidade para detecção de nAbs para ZIKV, visando atender à demanda por diagnóstico, avaliação vacinal e estudos epidemiológicos.

Objetivo:

Desenvolver teste de neutralização por redução de focos virais para detecção de nAbs para ZIKV em amostras de soro e comparar sua acurácia frente ao PRNT (padrão-ouro).

Metodologia:

Assim como no PRNT, amostras de soro são diluídas de forma seriada e desafiadas contra o ZIKV, sendo posteriormente inoculadas em placas com mono-

camada celular pré-formada e incubadas com meio semissólido. Entretanto, ao invés de esperar a formação dos plaques de lise provenientes do efeito citopático viral, o FRNT utiliza anticorpos monoclonais para marcar os focos de infecção mais precocemente. Para isso, decorrido o tempo de incubação, as placas então são lavadas (tampão PBS/Tween-20 0,05%), fixadas (paraformaldeído 4%), bloqueadas, marcadas com anticorpo monoclonal antinflavivírus conjugado a peroxidase (4G2-HRP) e reveladas com substrato *TrueBlue* (KPL). Para padronização e otimização do ensaio, foram avaliados diferentes parâmetros como densidade celular, meio e tempo de incubação final, ajuste do *input* viral e da diluição do anticorpo 4G2-HRP. Amostras humanas sabidamente positivas e negativas para ZIKV, assim como para DENV foram testadas em ambos os ensaios (PRNT e FRNT) para comparação dos resultados e análise estatística.

Resultado:

O FRNT apresenta tempo de incubação 50% menor e maior capacidade de análise de amostras quando comparado ao PRNT. O ponto de corte traçado preliminarmente obteve sensibilidade de 100% e especificidade de 93,18%, observando-se uma tendência a títulos mais altos das amostras positivas quando comparado ao PRNT (alta sensibilidade). Apesar das diferenças nas dosagens de títulos de nAbs entre as duas metodologias, observou-se uma ótima correlação entre os ensaios.

Conclusão:

O FRNT apresenta como vantagens a rapidez e maior capacidade de análise de amostras por ensaio em relação ao teste referência. Essas vantagens, somadas à alta correlação dos resultados obtidos nos diferentes ensaios possibilita a utilização do FRNT como alternativa ao PRNT em estudos epidemiológicos, desenvolvimento vacinais e diagnóstico.

Palavras-chave: Zika; FRNT; PRNT