

OTR.15 - Detecção e quantificação do vírus oncogênico Herpesvírus humano 8 em amostras de fluido oral utilizando curva padrão sintética

Amanda de Oliveira Lopes^{1*}; Lucas Ribeiro Teixeira¹; Natália Spitz Toledo Dias¹; Anderson Vicente de Paula²; Geovana Pereira²; Tania Regina Tozetto Mendoza²; Vanessa Salette de Paula¹.

¹Fiocruz/IOC;

²USP/Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Introdução:

O herpesvírus humano 8 (HHV-8) é um vírus oncogênico que está associado à neoplasias, como o Sarcoma de Kaposi (SK). Esta neoplasia é mais agressiva em portadores do HIV favorecendo a progressão da AIDS e ocasionando alta mortalidade nesses indivíduos. O HHV-8 pode ser detectado em taxas mais altas em fluido oral de indivíduos com HIV/HHV-8 e esta detecção em fluido oral pode ser útil para confirmar e monitorar a infecção e o risco de suas complicações. A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) é essencial por ser altamente sensível e específica, e por permitir a quantificação da carga viral. O método de quantificação absoluta depende de curva padrão eficiente para correta quantificação e monitoramento da infecção viral. Entretanto, as curvas utilizadas nos ensaios de qPCR para detecção e quantificação de HHV-8 são obtidas através de clonagem, método laborioso, que pode demandar muito tempo e custos. A curva sintética é uma alternativa a curva plasmidial por ser específica e sua produção precisar apenas da informação da sequência a ser amplificada, diminuindo, assim, o tempo e custo do processo.

Objetivo:

Avaliar o desempenho de uma curva padrão sintética para detecção e quantificação de HHV-8 em amostra de fluido oral.

Metodologia:

A curva sintética foi desenhada com 79 pares de bases referentes a uma região da ORF 26 do genoma do HHV-8. Para a utilização nos ensaios, a curva foi diluída de 10^{-1} até 10^{-14} e, após a otimização no sistema qPCR TaqMan[®],

foi utilizada para quantificar um painel de amostras composto por 8 amostras sabidamente negativas e 8 amostras sabidamente positivas de fluido oral de pacientes com HIV/SK. Anteriormente, as amostras de fluido oral de cada paciente (2mL) foram coletadas através de salivagem espontânea, que em seguida foram alíquotadas e estocadas à -70°C . As amostras positivas na qPCR foram submetidas ao Nested PCR e ao sequenciamento da ORF 26.

Resultado:

A curva padrão apresentou R^2 de 0,99, *slope* de -3,2, *y-intercept* de 40 e 104% de eficiência. O limite de detecção foi de 10^{10} até 10^2 cópias/mL. Além disso, HHV-8 foi detectado em 100% das amostras sabidamente positivas (8/8) pela qPCR, com carga viral variando de $1,7 \times 10^3$ cópias/mL a $1,4 \times 10^5$ cópias/mL. Em todas as amostras quantificadas a detecção de HHV-8 foi confirmada pelo sequenciamento. As amostras sabidamente negativas não apresentaram amplificação por nenhum dos testes.

Conclusão:

Desta forma, os resultados comprovaram o desempenho desta curva sintética na qPCR para detecção e quantificação de HHV-8 em amostras de fluido oral. A curva sintética é uma alternativa para substituição da curva plasmidial, e poderá ser utilizada para o monitoramento do Sarcoma de Kaposi.

Palavras-chave: Curva sintética; PCR em tempo real; Herpesvírus humano 8