

## R9. DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA PARTÍCULA CALIBRADORA PARA O KIT NAT HIV/HCV/HBV BIO-MANGUINHOS.

---

Daniele Rocha<sup>1</sup>; Elisabete Andrade<sup>1</sup>; Marcela Fontana<sup>1</sup>; Marisa Ribeiro<sup>1</sup>; Elaine Motta<sup>1</sup>; Daniela T. Godoy<sup>1</sup>; Antonio G. P. Ferreira<sup>1</sup>; Rodrigo Brindeiro<sup>2</sup>; Amilcar Tanuri<sup>2</sup>; Patricia Alvarez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Bio-Manguinhos;

<sup>2</sup> UFRJ.

---

**INTRODUÇÃO** O Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos está implementado em toda a hemorrede pública nacional, ampliando a segurança transfusional no Brasil. Até o momento, 9 milhões de bolsas de sangue já foram testadas e mais de 70 amostras em fase de janela imunológica foram detectadas. O Kit NAT HIV/HCV/HBV utiliza uma partícula viral mimética (VLP – *virus like particle*), biossegura, chamada partícula calibradora ou controle interno (CI), que controla todas as etapas do processo. Inicialmente, o conceito de CI consistia na competição da amplificação do alvo, com a falha esperada do calibrador em amostras positivas. Visando otimizar o sistema, além de ampliar ainda mais a sensibilidade do kit, um novo CI aperfeiçoado foi desenvolvido.

**OBJETIVO** Modificar a região alvo de ligação dos primers do CI para impedir a competição com os primers de HIV/WT e melhorar ainda mais o desempenho do kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos.

**METODOLOGIA** A técnica *Scramble Site Directed Mutagenesis* foi utilizada para modificar a região alvo no plasmídeo do CI com o objetivo de gerar um novo sítio de ligação para os primers do CI e impedir a competição com os primers do HIV/WT. Foram desenhados dois pares de primers direcionados para a mutagênese das regiões originais no plasmídeo (integrase) e foi utilizada a enzima *Pfu turbo*. A extensão dos iniciadores gera um plasmídeo contendo a região mutagenizada. Posteriormente, foi realizada a transformação da bactéria JM109 com o plasmídeo e a confirmação da mutagênese foi feita pela PCR do plasmídeo e sequenciamento. A transfecção foi realizada na célula 293T. O RNA do vírus gerado foi extraído e seu desempenho avaliado pela PCR em tempo real (qPCR) com primers específicos. Também foi avaliada a eficiência da transfecção realizando a PCR em tempo real com e sem a enzima transcriptase reversa (RT).

**RESULTADOS** A PCR convencional detectou o plasmídeo mutagenizado com a região do novo sítio de ligação. O sequenciamento do plasmídeo confirmou que a região de interesse foi mutagenizada, com 100% de concordância. A transfecção nas células 293T obteve excelente rendimento de aproximadamente  $10^8$  cópias/mL de vírus. A qPCR realizada a partir do RNA extraído do vírus, com os iniciadores do novo CI, apresentou desempenho satisfatório e o controle negativo não apresentou amplificação. A qPCR com e sem RT mostrou que quando não há a enzima o material extraído não amplifica. O novo CI aumentou a sensibilidade e reprodutibilidade do produto, principalmente em amostras com baixa carga viral de HIV.

**CONCLUSÃO** O NAT HIV/HCV/HBV Brasileiro é um produto diferenciado sob os aspectos científico e tecnológico, sendo um dos principais exemplos da política afirmativa do Ministério da Saúde. Sendo assim, o novo controle interno é extremamente importante para o aperfeiçoamento contínuo do kit e garantia da ampliação da segurança transfusional no Brasil.

**PALAVRAS-CHAVE** Kit NAT, aperfeiçoamento contínuo.