

R4 - Incorporação do 4º alvo, dengue, no Kit NAT HIV/HCV/ HBV brasileiro produzido por Bio-Manguinhos

Patricia Alvarez^{1*}; Elaine Costa¹; Elisabete Andrade¹; Daniele Rocha¹; Marcela Fontana¹; Roberta Bruno¹; Marisa Ribeiro¹; Antonio G. P. Ferreira¹

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

Para triagem de doadores de sangue no Brasil, atualmente são realizados ensaios NAT para HIV, HCV e HBV. Visando ampliar ainda mais a segurança transfusional, o Kit NAT está sendo aperfeiçoado para detectar, adicionalmente, amostras com o vírus da Dengue (DEN).

Objetivo:

Padronizar ensaio de diagnóstico molecular para detecção dos vírus Dengue na plataforma de PCR em Tempo Real, visando sua potencial incorporação como 4º alvo de detecção no Kit NAT HIV/HCV/HBV Brasileiro, produzido por Bio-Manguinhos. Para ampliar a segurança transfusional, o teste para detecção de Dengue está sendo ajustado e, aproveitando as bases técnicas do modelo atual do Kit NAT Brasileiro, poderá ser incorporado como um alvo adicional.

Metodologia:

Os iniciadores e sonda utilizados na padronização do ensaio estão localizados na região 3'NCR. Esta região é conservada, permitindo, assim, amplificar/detectar os quatro tipos de vírus DEN em uma única reação/detecção molecular. Em toda reação é utilizada uma partícula calibradora (PC), como controle interno do sistema. Até o momento, para a padronização da concentração de sonda e iniciadores, e para obtenção das provas de conceito, foram processadas amostras de cultura desse vírus de diferentes cepas, dos tipos 1, 2, 3 e 4. Para a inclusão do alvo Dengue no Modelo atual do Kit NAT HIV/HCV/HBV Brasileiro, será padronizado e utilizado um segundo ensaio triplex discriminatório: DEN, HBV e PC.

Resultados:

O processamento das amostras de cultivo dos diferentes tipos de Dengue demonstrou resultados bastante significativos, apresentando um bom desempe-

nho das curvas de amplificação de DEN e da PC, em uma mesma reação. Os testes de especificidade foram realizados com amostras verdadeiras negativas e demonstraram 100% de concordância. Em testes preliminares, obtivemos DEN VIC, HBV FAM e PC DYE3, como a melhor combinação das fluorescências. A extração das diferentes cepas de vírus foi feita em um sistema automatizado de extração de coluna de sílica usada no modelo atual do Kit NAT Brasileiro, além de outros sistemas de partículas magnéticas, automatizados.

Conclusão:

Os testes realizados mostraram que a reação duplex, por PCR em tempo real, para DEN e PC é satisfatória. A padronização do ensaio descrito foi realizada com amostras de cultura. Entretanto, para a validação do sistema há necessidade de testes frente a amostras clínicas positivas dos quatro tipos de vírus dengue. Estão em andamento experimentos para análise da reação triplex Dengue, HBV e PC, e estudos de avaliação da metodologia, o qual definirá as características técnicas, como os níveis de sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade entre outros. Atualmente, considerando a relevância epidemiológica de dengue, no Brasil, a incorporação deste novo alvo na triagem de doadores de sangue da Hemorede Pública permitirá ampliar ainda mais a segurança transfusional.

Palavras-Chave: Kit NAT; Dengue; RT-PCR