

## **REA 14 - Desenvolvimento de um sistema molecular de detecção e tipagem do vírus da Dengue**

Elaine Costa<sup>1</sup>; Elisabete Andrade<sup>1</sup>; Marisa Ribeiro<sup>1</sup>; Sthefanie Ribeiro<sup>1</sup>; Daniele Rocha<sup>1</sup>; Marcela Fontana<sup>1</sup>; Daniela T. Godoy<sup>1</sup>; Antonio G. P. Ferreira<sup>1</sup>; Patrícia Alvarez<sup>1\*</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae*, e apresenta propriedades antigênicas distintas que caracterizam quatro sorotipos denominados vírus dengue 1 (DENV 1), vírus dengue 2 (DENV 2), vírus dengue 3 (DENV 3) e vírus dengue 4 (DENV 4). São transmitidos aos humanos por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor. Dengue é a doença viral, transmitida por vetor, mais difundida mundialmente, com aproximadamente 390 milhões de casos reportados anualmente. A variabilidade genotípica dos DENV tem sido associada a distribuição geográfica e seu potencial epidêmico. O desenvolvimento de um ensaio para detecção e sorotipagem dos DENV facilita tanto no diagnóstico clínico como na vigilância epidemiológica deste agravo.

### **Objetivo:**

Padronizar um ensaio molecular para detecção e discriminação dos quatro sorotipos do DENV na plataforma de PCR em Tempo Real.

### **Metodologia:**

Os iniciadores e sondas utilizados na padronização do ensaio estão localizados em regiões conservadas, permitindo, assim, amplificar/detectar os quatro tipos de vírus Dengue em duas reações tríplices, uma reação para Dengue 1 e Dengue 2, e outra para Dengue 3 e Dengue 4 e em toda reação é utilizada um controle interno (CI) do sistema. Até o momento, para a padronização da concentração de sondas 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.

**Resultado:**

O processamento das amostras de cultivo dos diferentes tipos de Dengue demonstrou resultados bastante significativos, apresentando um bom desempenho das curvas de amplificação de DEN e do CI, em uma mesma reação. Os testes de especificidade foram realizados com amostras verdadeiramente negativas e demonstraram 100% de concordância. Em testes preliminares, obtivemos Dengue 1 com fluorescência, FAM, Dengue 2 VIC e CI DYE3; Dengue 3 VIC, Dengue 4 FAM e CI DYE3, como as melhores combinações das fluorescências. A extração dos ácidos nucleicos 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.

**Conclusão:**

Os testes realizados mostraram que as reações tríplice, por PCR em tempo real, para discriminação dos quatro sorotipos de Dengue e PC foram satisfatórias. Entretanto, para a validação do sistema há necessidade de testes frente a amostras clínicas positivas dos quatro tipos de vírus dengue. Além disso, amostras negativas para DENV e positivas para outros vírus, entre outros, ZIKAV e Chikungunya, serão utilizadas nos ensaios de especificidade. Atualmente, estão em andamento experimentos para avaliação das características técnicas, como os níveis de sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade entre outros. O desenvolvimento de um teste molecular discriminatório de Dengue é de suma importância, considerando-se a relevância epidemiológica de dengue, no Brasil.

**Palavras-chave: Vírus Dengue; Diagnóstico; PCR em tempo real**