

## Título: Prova de Conceito de um Ensaio Molecular para Sorotipagem do Vírus Dengue)

Autora: Elaine Motta Costa

### RESUMO

A Dengue é uma arbovirose presente em países tropicais e subtropicais e há centenas de anos ganhou grande importância e visibilidade. Durante os últimos anos, cerca de 2.5 a 3.6 bilhões de pessoas no mundo são consideradas suscetíveis a infecção pela Dengue. O vírus da Dengue pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e quatro sorotipos são bem conhecidos (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4). Os mosquitos do gênero *Aedes* são os principais vetores, principalmente o *Aedes aegypti*. Todos os sorotipos estão em co-circulação em todos os subtrópicos e trópicos. A Dengue grave está associada a infecções secundárias por um sorotipo diferente. A sorotipagem fornece um alerta precoce de epidemias de Dengue para melhorar o gerenciamento de pacientes e surtos. Uma estratégia global tem sido amplamente defendida destinada a aumentar a capacidade de vigilância e resposta a surtos, mudança de comportamentos e redução de doenças, usando o gerenciamento integrado de vetores, em conjunto com diagnósticos precoces e precisos. Desta forma, este estudo foi desenhado para desenvolver a prova de conceito de um ensaio molecular para sorotipagem do vírus Dengue baseado na qRT-PCR. Foram definidos conjuntos de iniciadores e sondas específicos para cada um dos sorotipos, e foram padronizados dois sistemas para detecção triplex: DENV-1/DENV-2/CI e DENV-3/DENV-4/CI. O equipamento FLEXNAT foi escolhido como sistema de extração de ácido nucléico, após a análise de critérios técnicos de seis equipamentos distintos. Para assegurar os parâmetros de análise do ensaio, foram definidos o *threshold* e *baseline* de cada um dos alvos. A avaliação de especificidade foi realizada para os quatro sorotipos, e o resultado foi de 100%. Para avaliação da sensibilidade do teste foram realizados testes de limite de detecção para cada sorotipo, os quais apresentaram o seguinte resultado: DENV-1, 4,95E+00 PFU/mL; DENV-2, 7,19E+00 PFU/mL; DENV-3, 1,46E+01 PFU/mL e DENV-4, 1,82E+01 PFU/mL. Adicionalmente, utilizamos a técnica de PCR digital para quantificar culturas de vírus, e os resultados demonstraram que nosso ensaio foi capaz de detectar os quatro sorotipos de DENV em amostras com  $\geq 20$  cp/reação. Seguindo recomendações da ANVISA, através da RDC 166 de 2017, realizamos a análise de precisão do nosso sistema, com resultados de CV menor que 15% para todos os alvos, como recomendado, e sem contaminação cruzada. O ensaio com o painel de interferentes, demonstrou que somente amostras hemolisadas interferiram no CT das amostras. Quando amostras de outras patologias foram testadas nenhuma delas apresentou resultados falsos-positivo ou reações inespecíficas. No desafio com amostras clínicas, nosso ensaio detectou uma amostra de DENV-1 e outra de DENV-4. Os resultados desse trabalho apresentam de forma satisfatória a prova de conceito de um ensaio molecular para sorotipagem do vírus da Dengue, que será uma proposta de produto nacional, diminuindo o custo de importação e ainda apresentando ganho tecnológico para o País.