

Comparação de duas técnicas de PCR em tempo real para detecção qualitativa do RNA do vírus da dengue em amostras de plasma de crianças do município de Araraquara/SP

Nathália C. S. Souza¹; Alvina C. Felix²; Exedito J. A. Luna², Ângela A. Costa³, Ana C. Mamana², Sergio R. S. L. C. Campos², Gerusa M. Figueiredo², Walter M. F.³, Cláudio S. Pannuti², José E. Levi²

¹*Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP), Universidade de São Paulo (USP), 05403-000, São Paulo, SP, Brasil. Email:nathaliasantiago@usp.br*

²*Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (IMTSP), Universidade de São Paulo (USP), 05403-000, São Paulo, SP, Brasil.*

³*Serviço Especial de Saúde de Araraquara (SESA/FSP/USP), 14800-350, Araraquara, SP, Brasil.*

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) é amplamente utilizada no diagnóstico laboratorial da dengue aguda por ser um método específico e sensível para a detecção do RNA dos DENV-1-4. Existem duas técnicas para detecção do RNA viral por qPCR, sendo a mais utilizada a Two-Step, que é a combinação do PCR por transcrição reversa (RT-PCR) com o qPCR, no qual o RNA é transformado em cDNA pela enzima transcriptase reversa utilizando-se *primers randômicos* e posteriormente amplificado, e detectado por qPCR. Já na técnica One-Step não é necessária a realização prévia da síntese de cDNA, pois devido ao reagente e ciclagem utilizados, toda a reação de síntese de cDNA, amplificação e detecção ocorre durante o qPCR. O objetivo deste trabalho foi comparar a sensibilidade das técnicas Two-Step e One-Step para detecção qualitativa do DENV RNA em amostras de plasma de crianças provenientes do município de Araraquara/SP. Foram testadas 115 amostras de plasma previamente positivas para DENV RNA pelo protocolo Two-Step. Nos dois protocolos foram utilizados primers e sonda genéricos que detectam igualmente os 4 sorotipos virais. Na técnica Two-Step o cDNA foi submetido a qPCR utilizando-se o seguinte protocolo: 5µL de cDNA, 1x Taqman Master Mix (Applied Biosystems™), 0,9 µM de primers e 0,25 µM de sonda em um volume final de 25 µL e na One-Step o RNA foi submetido à qPCR utilizando-se: 1x Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies™) e o PrimeTime® Std qPCR Assay (Integrated DNA Technologies™) contendo primers e sonda nas concentrações de 0,59 µM e 0,16 µM, respectivamente. Todas as amostras foram positivas pela técnica One-Step. A comparação das técnicas foi feita através do cálculo da média e desvio padrão da diferença de valores obtidos de CT e a técnica One-Step mostrou melhor desempenho quanto à sensibilidade com diferença média de 6,3 CTs (DP 2,6; intervalo 1,2-18,7). Portanto, a técnica One-Step mostrou ser mais sensível para detecção qualitativa do DENV RNA por qPCR.

Palavras-chave: Dengue; PCR em tempo real;

Apoio: SANOFI