

268

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) ATRAVÉS DE HIBRIDIZAÇÃO EM MICROPLACAS.

Nicole Nascimento da Fré, Cintia Costi, Tarciana Grandi, Cláudia Maria Dornelles da Silva, Arnaldo Zaha, Maria Lucia Rosa Rossetti (orient.) (IPA).

O diagnóstico laboratorial da hepatite C pode ser realizado através de análises sorológicas e baseadas em técnicas de biologia molecular. Esse último é considerado "padrão-ouro" por ser o único capaz de discriminar pacientes com infecção crônica, daqueles considerados "curados", porém apresenta alto custo e falta de validação no país. Em razão destas dificuldades, novas técnicas de biologia molecular têm sido propostas como alternativa. O presente estudo teve como objetivo o aprimoramento de uma metodologia *in house* para purificação do RNA do HCV, bem como sua detecção e genotipagem, utilizando hibridização do produto amplificado (PA) em microplacas, a partir da análise de 24 amostras de plasma. A metodologia de extração baseou-se no protocolo descrito por Boom et al (1990) com algumas modificações e o resultado da mesma foi comparado com um método comercial. Os métodos foram analisados através da técnica de RT-PCR com o kit *SuperScript™ One-Step RT-PCR*, seguido de visualização PA em UV, após eletroforese em gel de agarose. A região 5'NCR do HCV foi selecionada como alvo para amplificação com *primers* biotinizados. Os PAs foram então hibridizados em microplaca para sua detecção e genotipagem. Foram utilizados no teste conjugado de estreptavidina-peroxidase e o substrato TMB. O resultado dessa reação de cor foi quantificado em espectrofotômetro. A porcentagem de concordância entre as técnicas de extração utilizando a metodologia *in house* e a comercial foi de 95, 8% (23/24). Testes para estabelecer as condições do protocolo colorimétrico foram realizados utilizando amostras com resultado prévio conhecido para a presença/ausência do RNA viral e o seu genótipo. Sendo assim, tanto o protocolo *in house* de purificação do RNA quanto o protocolo colorimétrico parecem apresentar um bom potencial para serem usados no diagnóstico e genotipagem de HCV. Um número maior de amostras será testado a fim de verificar a acurácia do método proposto.