

Artigo

Sensibilidade da técnica de reação em cadeia da polimerase para HIV-1 em relação à técnica de ensaio imunoenzimático

Priscila R. Rezende¹
Giselle B. Alves¹
Luciana M.C. Maradei-Pereira¹
Teonice J.L. Vale²
Adriana S.C. Pimenta¹
José A.R. Lemos^{1,3}

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, AIDS, uma doença de grande preocupação médica. O genoma deste vírus encontra-se arranjado em nove genes individuais e por duas estruturas idênticas denominadas de repetições terminais nas extremidades 5' e 3'. Tivemos como objetivo analisar a sensibilidade do teste da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o teste de ensaio imunoenzimático (ELISA), como teste para triagem de doadores de sangue para HIV. Foram analisadas 200 amostras de doadores e pacientes, da Fundação HEMOPA, com padrão positivo e indeterminado no teste ELISA. Na triagem sorológica pelo ELISA tiveram como resultado 35 amostras positivas, 75 amostras negativas e 90 amostras indeterminadas as quais foram submetidas ao teste pela PCR. Vinte e cinco amostras tiveram resultado positivo e 175 amostras negativas. Com estes resultados concluímos que a reação de PCR apresenta-se positiva somente nas amostras em que o teste ELISA apresenta relação DO/cutoff, acima de 3.
Rev. bras. hematol. hemoter., 2002, 24(1): 25-28

Palavras-chave: HIV-1, PCR, ELISA

Introdução

O vírus da imunodeficiência humana pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Lentivirinae*, gênero *Lentivirus* (1), o qual é o agente etiológico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, AIDS, uma das doenças de grande preocupação médica e social (2).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem melhorado significativamente o diagnóstico molecular nos últimos anos, seguindo uma

rápida replicação *in vitro* e a subsequente identificação de seqüências específicas do ácido nucléico. A amplificação de seqüências de DNA humano e de muitos DNA alvos resulta, freqüentemente, em uma produção abundante e específica do fragmento desejado, permitindo então, a detecção simples e sem ambigüidade do produto de diagnóstico (3).

O princípio da técnica de PCR é simples e baseia-se em ciclos de síntese de DNA, onde cada ciclo é constituído por três passos: 1) desnaturação da dupla fita de DNA,

1 - Divisão de Biologia Molecular, Fundação HEMOPA – Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, Belém-PA

2 - Divisão de Sorologia, Fundação HEMOPA – Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, Belém-PA

3 - Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Correspondência para: José Alexandre Rodrigues de Lemos

Fundação HEMOPA - Divisão de Biologia Molecular. Travessa Padre Eutíquio, 2109. 66033-230. Belém. PA
Fone: (91) 242-9100 ramal 244. Fax: (91) 242-5435 • E-mail: lemos@ufpa.br

2) anelamento dos *primers*, e 3) extensão dos *primers*. Um ciclo faz tipicamente ~3-5 minutos e é repetido 20-40 vezes. Um tubo da reação de PCR contém uma mistura de tampão, nucleotídeos, *primers*, enzima (*Taq*-DNA-polimerase) e ácido nucléico do espécime de interesse (4).

Neste trabalho tivemos como objetivo a avaliação da sensibilidade da técnica de PCR em indivíduos soro-positivos ou indeterminados para HIV-1 na triagem sistemática de doadores de sangue na Fundação HEMOPA (Belém-Pará) em relação à técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA).

Casuística e Método

Foram selecionadas 200 amostras de doadores e pacientes da Fundação HEMOPA, com padrão positivo, indeterminado e negativo para HIV-1 e HIV-2, pela triagem da técnica de ELISA para serem submetidas a confirmação pela técnica de PCR.

Foram extraídos os DNAs de 200 amostras com o kit GonomicPrep™ Amersham Pharmacia®.

Com a obtenção do DNA da amostra a ter o seu resultado confirmado, foi realizado o exame da reação em cadeia da polimerase, do tipo Nested-PCR. Para a primeira reação 1 preparou-se o mix em um tubo de 0,2mL, multiplicando a quantidade de amostras mais um, pela quantidade de reagentes. Os reagentes utilizados foram: água bidestilada, tampão, cloreto de magnésio, DNTPs, primer 1 com seqüência 5'-CAA TGT ACA CAT GGA ATT-3', primer 2 com seqüência 5'-ATT ACA GTA GAA AAA TTC CC-3' (GenBank accession number K02007) e 1U de *Taq*-DNA-polimerase. Distribuiu-se 22µL do mix em cada tubo de 0,2mL. A cada tubo foram adicionados 3µL da amostra de DNA. As amostras foram levadas ao termociclador com o seguinte programa: 1 ciclo de 94°C 5', 54°C 2'; 35 ciclos de 72°C, 94°C, 50°C e 1 ciclo de 72°C 10'. Ao término da primeira reação, os tubos foram abertos cuidadosamente para evitar contaminação e adicionados 25 µL de mix para a segunda

reação, que foi preparada da mesma maneira que a primeira reação, apenas substituiu-se os *primers* externos pelos internos, sendo o *primer* interno 1 com seqüência 5'-GCA GTC TAG CAG AAG AAG-3' A e o primer interno 2 com seqüência 5'-TGG GTC CCC TCC TGA GGA T-3' (GenBank accession number K02007). Os tubos foram levados ao termociclador e acionou-se novamente o programa de 1 ciclo de 94°C 5', 54°C 2'; 35 ciclos de 72°C, 94°C, 54°C e 1 ciclo de 72°C 10'.

Ao término da segunda reação, procedeu-se à detecção do produto de PCR amplificado através eletroforese em 100V por uma hora em gel de agarose a 2%, contendo 30µL de brometo de etídio a 1%, imerso em tampão TBE 1X. Adicionou-se em cada poço do gel os 50µL do produto de PCR mais 5µL de azul de bromofenol. Foi detectado um fragmento de 299pb correspondente a alça C2-V3 do gene *env* do provírus integrado na posição 7029-7327 (GenBank K02007) (5).

Resultados

As 200 amostras doadores de sangue que foram submetidas à triagem sorológica pelo teste ELISA tiveram o seguinte resultado: 35 amostras positivas, 75 amostras negativas e 90 indeterminadas. Todas foram submetidas à reação de PCR, as quais tiveram como resultado 25 amostras positivas e 175 amostras negativas (Tabela 1).

Os resultados do teste de ELISA tiveram como critérios a análise dos resultados de dois testes de marcas diferentes: um de lisado viral capaz de diagnosticar amostras contaminadas HIV-1 e HIV-2 mais o grupo O e outro também

Tabela1: Resultados de teste ELISA e PCR

ELISA	PCR	
	POS	NEG
POS	25	10
INC	0	90
NEG	0	75

de lisado viral capaz de diagnosticar HIV-1 e HIV-2. Os dois testes basearam seus resultados numa margem de 10% do *cut off*, sendo os positivos as amostras que apresentaram densidade ótica igual ou maior que +10%, os negativos aqueles que apresentaram densidade ótica igual ou menor - 10% e os indeterminados as amostras que apresentaram densidade ótica entre +10% e -10% (método utilizado por Gonçalves *et al*) em pesquisa com vírus da hepatite C (6).

Para que o resultado final (análise dos dois testes) seja dado como positivo é preciso que os dois testes tenham resultado positivo e negativo quando os dois testes são negativos e, conseqüentemente, indeterminado quando um dos testes é positivo e o outro negativo ou *borderline*.

Discussão

Foi observado que as reações de PCR apresentaram amplificação nas amostras com teste ELISA com relação DO/C entre 3 e 19,9 (3), ou seja, somente foi observada amplificação por PCR em amostras com ELISA a partir de DO/C >3.

Não foi observada em 10 de 35 com teste ELISA positivo (28%) e este fato pode ser explicado pela possível mutação na região de onde se ligam os *primers*. Esta observação permite concluir que a ausência de amplificação na reação de PCR não pode ser usada como teste confirmatório negativo para os casos com teste ELISA positivo ou indeterminado. Por este motivo, a PCR pode ser usada como teste confirmatório somente quando apresentar amplificação, ou seja, positivo, para os testes com resultado tanto positivo como indeterminado para ELISA.

Portanto, é recomendável que sejam usados *primers* a partir de consultas no GenBank de isolados brasileiros, para corrigir o problema de especificidade dos mesmos, que devem ser específicos para a população brasileira. Além disso, é necessário que seja feito seqüenciamento da região analisada do vírus, a

alça V3, para verificar possíveis mutações que possam ter levado à inespecificidade dos *primers* nestas 10 amostras analisadas.

Observou-se também que das amostras indeterminadas no teste ELISA, por apresentarem resultado negativo em um teste e positivo em outro, 6 amostras apresentaram relação DO/C entre 6,2 e 17,9 em um teste e zero em outro, sendo que todas com resultado negativo para PCR. Esta observação pode ser indicativa de reação cruzada devido à alta sensibilidade. Porém, o vírus pode ter sofrido mutações a ponto de não afetar somente a seqüência de ligação do *primer*, mas também os epítomos utilizados no teste ELISA. Assim, tendo em vista estes resultados, o seqüenciamento, pelo menos da alça V3, torna-se recomendável para melhor compreensão de possível mutação dessa região e o seu papel na biologia do HIV-1.

Polymerase chain reaction sensitivity against enzyme immuno assay test virus HIV -1

Priscila R. Rezende, Giselle B. Alves, Luciana M.C. Maradei-Pereira, Teonice J.L. Vale, Adriana S.C. Pimenta, José A.R. Lemos

Abstract

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is the etiological agent of the Acquired Immunodeficiency Syndrome, (AIDS), a disease of great concern in the medical world. The genome of this virus is found arranged in nine genes and by two identical structures named terminal repetitions on the 5' and 3' extremities. As our objective, the sensitivity of the Polymerase Chain Reaction (PCR) and Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) tests were analyzed as an evaluation for blood donors who are infected with HIV. Two hundred samples from donors and patients from the HEMOPA Foundation were analyzed, with the positive and indeterminate standard of the ELISA test. In the ELISA test selection, the results were thirty-five positive samples, seventy-five negative samples

and ninety indeterminate samples. These samples were subsequently submitted to the PCR test where twenty-five samples had a positive result and one hundred seventy five had negative results. With these results we conclude that only samples that had a relation between the optical density and the cutoff above three (ELISA) were found positive in the PCR test.

Rev.bras.hematol.hemoter.,2002,24(1): 25-28

Keywords: HIV-1, PCR, ELISA

Referências Bibliográficas

1. Coffin JM: *Structure and Classification of Retrovirus*. In: Levy J. *The Retroviridae*. Plenum Press, New York 1993; 19-45.
2. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al: *Viral Dynamics in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. **Nature** 1995; 373:117-22.
3. Zazzi M, Romano L, Peruzzi F, Toneatto S, De Milito A, et Al.: *Optimal Conditions for Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA by Polymerase Chain Reaction with Nested Primers*. **Mol. Cell. Probes** 1993; 7: 431-437.
4. Schochetman G, et al: *Polymerase Chain Reaction*. **J. Infect. Dis.** 1988; 158: 1154-1157.
5. Covas DT, Biscaro TA, Kashima S, Duarte G, Machado AA: *High Frequency of the GWG (pro Trp) Envelope Variant of HIV-1 in Southeast Brazil*. **J. Acq. Imm. Def. Syndr. Hum. Retrovirol.** 1998; 19: 74-79.
6. Gonçalves NSL, Costa FF, Vassallo J, Gonçalves Jr FL: *Diagnosis of Hepatitis C Virus in Brazilian Blood Donors Using a Reverse Transcriptase Nested Polymerase Chain Reaction: Comparison with Enzyme Immunoassay and Recombinant Protein Immunoblot Assay*. **Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo** 2000; 42 (5): 263-267.

Recebido: 10/12/01

Aceito: 24/01/02