

# Prêmio "Melhor Poster" apresentado no VII Encontro de Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - 2010: Otimização da PCR convencional e em tempo real para o diagnóstico laboratorial de infecção por HTLV-1 e HTLV-2

Emanuela Avelar Silva COSTA<sup>1,2</sup>, Mariana Cavalheiro MAGRI<sup>2,3</sup>, Adele CATERINO-DE-ARAÚJO<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Controle de Doenças, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Área Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

<sup>2</sup>Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz de São Paulo

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área, Análises Clínicas

**E**m vista das dificuldades encontradas no diagnóstico confirmatório sorológico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2), no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo<sup>1,2</sup>, os ensaios moleculares de amplificação genômica, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a PCR em tempo real, têm sido usados para a obtenção de resultados conclusivos para o diagnóstico, principalmente em casos com padrão indeterminado persistentes no *Western blot*.

Com a finalidade de otimizar e determinar a sensibilidade das reações de PCR *nested* e PCR em tempo real, para a amplificação dos segmentos *tax* e *pol* do genoma proviral de HTLV-1 e HTLV-2, foram utilizadas amostras de DNA extraídas de duas linhagens celulares: C91/PL (infectada por HTLV-1) e BBF (infectada por HTLV-2), e protocolos descritos em literatura<sup>3-6</sup>. A pesquisa de segmento do gene da albumina humana foi feita como controle endógeno de reação. Foram realizadas diluições seriadas de DNA alvo partindo de uma concentração inicial de 1.000 ng/ $\mu$ L, até a concentração final de 1

pg/ $\mu$ L. Ajustes no número de ciclos de amplificação, tempo de ciclagem e na composição e diluição de *primers* e sondas (50, 25 e 12,5 pmol/ $\mu$ L) foram feitas em todas as PCRs.

A PCR em tempo real para albumina humana foi capaz de detectar 10 pg/ $\mu$ L de DNA alvo. A sensibilidade das PCRs para HTLV-1 foi semelhante para *tax* e *pol* (100 ng/ $\mu$ L), e para HTLV-2 as PCRs *pol* foram mais sensíveis (1.000 pg/ $\mu$ L). No entanto, as curvas de amplificação da PCR em tempo real para HTLV-2 não apresentaram o padrão esperado, e quando testado o gene da albumina humana, sua positividade foi inferior à da linhagem infectada por HTLV-1 (250 ng/ $\mu$ L vs. 10 pg/ $\mu$ L). Para descartar problemas com os *primers* e sonda da PCR em tempo real, foi utilizada uma amostra clínica HTLV-2 positiva (CP-2) que resultou em boas curvas de amplificação e alta sensibilidade. Esses resultados permitiram supor que o DNA proveniente da linhagem BBF possuía inibidores de reação. Assim, esta linhagem foi abandonada e o DNA/CP-2 passou a ser usado como controle positivo nas reações de PCR para HTLV-2.

---

Concluindo, as reações de PCR convencional (*tax* e *pol*) e em tempo real (*pol*) foram otimizadas, sendo que, para HTLV-1, ambas apresentaram a mesma sensibilidade e podem ser utilizadas no diagnóstico desta infecção. Já para HTLV-2, as PCRs (*pol*) se mostraram mais sensíveis, podendo ser utilizada tanto a PCR convencional como a em tempo real.

---

## REFERÊNCIAS

1. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2008; 42: 149-55.
2. Caterino-de-Araujo A. Diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) em população de risco: passado, presente e futuro. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2009; 68(2): 182-6.
3. Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II seropositive individuals. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 1605-7.
4. Tuke PW, Luton P, Garson JA. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of "nested" PCR products. *J Virol Methods.* 1992; 40: 163-74.
5. Tamegão-Lopes BP, Rezende PR, Maradei-Pereira LMC, Lemos JAR. HTLV-1 and HTLV-2 proviral load: a simple method using quantitative real-time PCR. *Rev Soc Bras Med Trop S Paulo.* 2006; 39: 548-52.
6. Costa JMP, Segurado AC. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol.* 2009; 44: 185-9.