

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO PARANÁ

MIRIAM RIBAS ZAMBENEDETTI

CONSTRUÇÃO DE UM CONTROLE INTERNO DERIVADO DE BACTERÍÓFAGO
PARA UTILIZAÇÃO EM UM TESTE DE DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C
BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL

CURITIBA
2010

MIRIAM RIBAS ZAMBENEDETTI

CONSTRUÇÃO DE UM CONTROLE INTERNO DERIVADO DE BACTERIÓFAGO
PARA UTILIZAÇÃO EM UM TESTE DE DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C
BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Processos Biotecnológicos.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger
Co-orientadora: Dr.^a Daniela Parada Pavoni

CURITIBA

2010

TERMO DE APROVAÇÃO

MIRIAM RIBAS ZAMBENEDETTI

CONSTRUÇÃO DE UM CONTROLE INTERNO DERIVADO DE BACTERIÓFAGO
PARA UTILIZAÇÃO EM UM TESTE DE DETECÇÃO DO VÍRUS DA HEPATITE C
BASEADO EM PCR EM TEMPO REAL

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger
Departamento de Biologia Molecular e Celular, UFPR

Prof. Dr. Alejandro Correa Dominguez
Departamento de Biologia molecular e Celular, UFPR

Dr.^a Sueli Massumi Nakatani
Laboratório Central do Estado

Dr.^a Celina de Oliveira Poersch
Instituto Carlos Chagas

Prof. Dr. Stênio Perdigão Fragoso
Departamento de Biologia Molecular e Celular, UFPR

Curitiba, 02 de março de 2010.

Ao Instituto Carlos Chagas - Fiocruz
Paraná que financiou, coordenou e permitiu a
realização em suas dependências de toda a fase
experimental deste projeto

Aos meus filhos Gustavo e Henrique e ao meu esposo Vóldi com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho e incansável apoio durante o período de elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me ensinaram a lutar e buscar pelas coisas que quero.

Ao professor Dr^o. Carlos Ricardo Soccol e a professora Dr.^a Luciane Ivandenbergh, coordenador e vice-coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Bioprocessos pela criação deste curso.

Ao Dr^o. Marco Aurélio Krieger, meu orientador, pela sua coragem e ousadia de trabalhar com novas idéias e conceitos e que mesmo sem me conhecer acreditou em meu trabalho e meu deu a oportunidade de realizar este projeto.

A todos os diretores do Instituto Carlos Chagas por me disponibilizarem um ambiente tão estimulante e acolhedor.

À Dr.^a Celina de Oliveira Poersch e ao Dr. Alejandro Correa Dominguez que me ajudaram a dar os primeiros passos na elaboração e execução deste trabalho.

Á Dr.^a. Daniela Parada Pavoni, minha co-orientadora que me proporcionou muitos dos conhecimentos necesssários e sempre ouviu com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam e foi essencial no momento da redação e revisão final desta tese.

Ao Dr^o. Stenio Perdigão Fragoso por sua generosidade e por muitos dos conhecimentos na área da biologia molecular.

Aos dirigentes do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná e a todos os colegas desta instituição pelo apoio e incentivo a minha participação neste curso de mestrado.

Aos colegas do Laboratório pela amizade, ajuda, sugestões, ensinamentos, e em especial, a Andréia Cristine Dallabona, Camila Borges Suarez, Maykol Adrian Noll que de uma forma gentil sempre colaboraram comigo.

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná em especial a Dr.^a. Sueli Massumi Nakatani pelas amostras utilizadas nesta tese.

A todos agradeço profundamente e dedico o resultado deste trabalho.

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não têm os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.

Albert Einstein

RESUMO

A hepatite C hoje representa um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Pelo menos 3% da população mundial está infectada. Dos casos existentes, 15% são curados e 85% tornam-se crônicos. 20% dos crônicos evoluem para cirrose hepática e 4% para formas mais graves de doenças do fígado. Não há vacinas disponíveis e os tratamentos usados são de eficácia limitada. Desta forma um diagnóstico correto é essencial e somente a utilização de técnicas bem padronizadas e monitoradas com controles internos podem trazer esta garantia e assegurar a interpretação conclusiva dos achados obtidos evitando a liberação de resultados falso-positivos ou falso-negativos que podem comprometer um diagnóstico final. Baseando-se nestas informações foi feita a proposta deste trabalho cujo objetivo principal foi o desenvolvimento de um controle interno derivado de um bacteriófago estável e não infeccioso para um teste de detecção do vírus da hepatite C baseado em PCR em tempo real. Este controle por ser um vírus RNA como o HCV, pode controlar a metodologia desde a extração até a amplificação. Na construção desse controle foi utilizado o RNA comercial do bacteriófago MS2. O genoma inteiro do fago amplificado por PCR foi inserido no plasmídeo pGEM[®]-T Easy originando o pGEM[®]-T Easy - MS2, cuja clonagem produziu quantidade suficiente do genoma para a construção do pET-47b(+)-MS2. Neste plasmídeo foi inserido, no gene da replicase do MS2, uma sequência sintética com 144 bases derivada da região 5' UTR do HCV originando o pET-47b(+)-MS2-SS. Nesta sequência algumas bases foram alteradas permitindo o desenho de uma sonda para distinguir na PCR em tempo real o controle interno do HCV. Este plasmídeo foi transformado na bactéria BL21(DE3)pLyS e foi usado para expressar o bacteriófago MS2 recombinante que é o controle interno competitivo (CIC). Simultaneamente, expressou-se o MS2 a partir do vetor pET-47b(+)-MS2 que serviu como padrão na quantificação do MS2 recombinante e que também foi testado como um controle interno não competitivo na PCR em Tempo Real. Padronizou-se reações multiplex "two step" e "one step" para as combinações CIC/HCV usando os mesmos "primers" para amplificar o HCV e o CIC e sondas para distinguir os dois alvos. Para as combinações MS2/HCV utilizou-se "primers" e sondas específicas para cada um dos alvos. Foram estudadas diversas concentrações destes controles e definiu-se que 0,025 PFU eq. do CIC e 0,1 PFU do MS2 são as quantidades ideais para serem adicionadas à amostra clínica antes de extração do RNA, porque não interferem na detecção de amostras com cargas virais altas e baixas. Foram conduzidos também estudos para avaliar-se a estabilidade e verificou-se que a estocagem a 4°C tanto do CIC como do MS2 garante a manutenção da carga viral ao longo do tempo analisado. Portanto o presente trabalho mostrou a viabilidade técnica do desenvolvimento e da utilização de dois controles internos em uma metodologia diagnóstica e abriu perspectivas para a criação de novos controles, uma vez que os plasmídeos construídos podem servir como base para o desenvolvimento de controles específicos para metodologias diagnósticas de outras doenças causadas por vírus RNA.

ABSTRACT

Hepatitis C is a serious public health problem in Brazil and in the world. At least 3% of world population is infected, there is no vaccine available and the treatment used is of limited effectiveness. Around 85% of patients evolve to chronic phase, 20% of them develop liver cirrhosis and 4% other serious hepatic diseases. In this way a diagnostic tool with high sensitivity and specificity and quality control measures are instruments to ensure the correct interpretation of the diagnosis and prevention of false positives and false negatives results. Therefore the main objective of this work was to develop a stable internal control derived from non-infectious bacteriophage for hepatitis C virus detection test based on real-time PCR. This control is a RNA virus that can control the methodology from extraction to amplification. In the construction of this control it was used a commercial bacteriophage MS2 RNA. The entire genome of the phage amplified by PCR was inserted into plasmid pGEM[®]-T Easy resulting in the pGEM[®]-T Easy - MS2, which produced enough genome for the construction of pET-47b(+) - MS2. It was inserted into the MS2 replicase gene a synthetic sequence of 144 bases derived from 5' UTR region of HCV resulting in the pET-47b(+) - MS2 - SS. In this sequence a few bases were exchanged allowing the design of a probe to distinguish in the real-time PCR the internal control from HCV. This plasmid was transformed in *E. coli* BL21(DE3)pLyS that expressed the recombinant bacteriophage MS2, the competitive internal control (CIC). At the same time the wild type MS2 was expressed from the pET-47b(+) - MS2 and used as the standard quantification of recombinant MS2 (CIC). Wild type MS2 was also tested as a *non-competitive* internal control in real-time PCR. Multiplex reactions "two step" and "one step" were standardized for combinations of CIC/HCV using the same primers to amplify the HCV and CIC and probes to distinguish the two targets. For the combination MS2/HCV we used primers and probes specific for each target. We studied different concentrations of these controls and set 0.025 PFU eq. of CIC and 0.1 PFU of MS2 as the ideal amount for be added to the clinical sample prior to extraction because they do not interfere with the detection of high and low viral loads samples. We conducted studies to evaluate the stability of phage solution and found that the storage at 4°C of both CIC and the MS2 ensures the viral load maintenance over the assessed time. Therefore this study has demonstrated the technical feasibility of the development and use of two internal controls in a diagnostic method and allows the creation of other controls since the plasmids may serve as a basis for developing controls for specific diagnostic methods for other RNA viral diseases.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DO HCV.....	5
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA. DAS ETAPAS DE UMA PCR EM TEMPO REAL COM TaqMan.....	12
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DE UM CONTROLE INTERNO PARA MÚLTIPLOS PATÓGENOS.....	26
FIGURA 4 - SISTEMA DE EMPACOTAMENTO DO RNA ARMORED.....	28
FIGURA 5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA PARA O MS2.....	31
FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DO MS2.....	32
FIGURA 7 - CICLO DE VIDA DO BACTERIÓFAGO MS2.....	36
FIGURA 8 - "PHAGE DISPLAY" USANDO VLP(S) DO MS2.....	39
FIGURA 9 - MAPA CIRCULAR DO VETOR pGEM [®] - T Easy.....	54
FIGURA 10 - MAPA CIRCULAR DO VETOR pET-47b(+)......	60
FIGURA 11 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENOMA DO BACTERIÓFAGO MS2	67
FIGURA 12 - A: SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO 5' UTR DO HCV (130-273) B: SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA SEQUÊNCIA SINTÉTICA.....	68
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MONTAGEM DO CONTROLE INTERNO.....	94
FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DO MS2 EM PCR(S) FEITAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE REAGENTES.....	97
FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO PARA O PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DO MS2 COM A ENZIMA GoTAQ [™] DNA POLYMERASE.....	98
FIGURA 16 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES DA TRANSFORMAÇÃO DA LIGAÇÃO DO MS2 AO pGEM [®] -T Easy APÓS A TÉCNICA DE "TOOTH PICK".....	99
FIGURA 17 - ELETROFORESE PARA O VETOR pGEM [®] -T Easy - MS2.....	100
FIGURA 18 - DIGESTÃO pGEM [®] -T Easy - MS2 COM <i>Not</i> I E <i>Eco</i> RI.....	101
FIGURA 19 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DE CLONAGEM DO VETOR pET-47b(+)......	103

FIGURA 20 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA DIGESTÃO DO pET-47b(+) COM AS ENZIMAS <i>Xba</i> I E <i>Xho</i> I E DO pGEM [®] -T Easy - MS2 COM <i>Not</i> I.....	104
FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES DA TRANSFORMAÇÃO DA LIGAÇÃO pET-47b(+) AO MS2 APÓS À TÉCNICA DE "TOOTH PICK".....	105
FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DOS "PRIMERS" DESENHADOS NO GENOMA DO MS2.....	106
FIGURA 23 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS AMPLICONS OBTIDOS NAS PCR(s) FEITAS PARA COMPROVAR A PRESENÇA DO MS2 NO VETOR pET47b(+)	106
FIGURA 24 - AMPLICONS DE PCR(s) FEITAS COM O "PRIMER" T7 PROMOTER EM COMBINAÇÃO COM "PRIMERS" REVERSOS ESPECÍFICOS PARA O MS2.....	107
FIGURA 25 - DIGESTÃO pUC57 - SS COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bam</i> HI.....	108
FIGURA 26 - ELETROFORESE PARA O PRODUTO DA DIGESTÃO DO VETOR pET47b(+) - MS2 COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Bam</i> HI.....	109
FIGURA 27 - A e B: AMPLICONS OBTIDOS NA PCR FEITA COM OS "PRIMER" MS2-F4 e MS2-R2 PARA TRIAGEM DOS CLONES COM O VETOR pET47b(+)-MS2 - SS.....	110
FIGURA 28 - A E B: AMPLICONS DA PCR FEITA COM OS "PRIMERS" HCV-F E MS2-R2 PARA OS CLONES DA TRANSFORMAÇÃO DA LIGAÇÃO DA SEQUÊNCIA SINTÉTICA AO VETOR pET-47b(+) - MS2.....	111
FIGURA 29 - AMPLIFICAÇÃO DO CI MS2 USANDO SYBR [®] Green.....	115
FIGURA 30 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DOS AMPLICONS DO CI MS2.....	116
FIGURA 31 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CI MS2 USANDO SONDA	117
FIGURA 32 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CONTROLE INTERNO MS2.....	118
FIGURA 33 - GRÁFICO CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA x C _T DOS DADOS RELATIVOS DA FIGURA 32.....	119
FIGURA 34 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO MS2 COM AS ETAPAS DE ANELAMENTO E EXTENSÃO A 60°C.....	120
FIGURA 35 - AMPLIFICAÇÃO DO MESMO cDNA DO MS2, COM ANELAMENTO A 50°C E A EXTENSÃO A 72°C.....	120

FIGURA 36 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CIC USANDO SYBR®Green E A COMBINAÇÃO DE "PRIMERS" HCV-F e HCV-R2.....	121
FIGURA 37 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DOS AMPLICONS DO CIC MOSTRADOS NA FIGURA 36.....	122
FIGURA 38 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CIC USANDO SYBR®Green E A COMBINAÇÃO DE "PRIMERS" HCV-F e HCV-R3.....	122
FIGURA 39 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DOS AMPLICONS DO CIC MOSTRADOS NA FIGURA 38.....	123
FIGURA 40 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CIC USANDO OS "PRIMERS" HCV-F/HCV-R2 e HCV-F/HCV-R3 E A SONDA HCVSCI3 1p	124
FIGURA 41 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CIC.....	125
FIGURA 42 - GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA x C _T DOS DADOS RELATIVOS DA FIGURA 41.....	125
FIGURA 43 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DE TRÊS AMOSTRAS DO PAINEL COMERCIAL "HCV OptiQuant HCV Viral" COM A SONDA HCV-S 5 pmol/ul E 1 pmol/ul.....	127
FIGURA 44 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDAS PARA AS AMOSTRAS DE HCV	128
FIGURA 45 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DO PAINEL OPTIQUANT	128
FIGURA 46 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CI MS2 USADA NA QUANTIFICAÇÃO DO CIC	130
FIGURA 47 - GRÁFICO CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA x C _T DOS DADOS RELATIVOS DA FIGURA 46.....	130
FIGURA 48 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CIC SEM A ADIÇÃO DO HCV.....	133
FIGURA 49 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HCV, SEM A ADIÇÃO DO CIC	134
FIGURA 50 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES DE HCV (CARGA VIRAL 682.000 UI/ml) COM O CIC.....	135
FIGURA 51 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES DO HCV (CARGA VIRAL 180.000 UI/ml) COM O CIC.....	136
FIGURA 52 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES CIC/PLASMA	139

FIGURA 53 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES CIC + HCV.....	140
FIGURA 54 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES HCV (545.600 UI/ml) COM O CIC.....	143
FIGURA 55 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES DO HCV (CARGA VIRAL 144.000 UI/ml) COM O CIC	144
FIGURA 56 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES HCV (CARGA VIRAL 1.270 UI/ml) COM O CIC.....	145
FIGURA 57 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES HCV (1.270 UI/ml) COM O CIC.....	146
FIGURA 58 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES MS2/PLASMA.....	148
FIGURA 59 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES HCV/MS2.....	149
FIGURA 60 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES HCV (545.600 UI/ml) COM O CI MS2.....	152
FIGURA 61 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES HCV (144.000 UI/ml) COM O CI MS2.....	152
FIGURA 62 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES HCV (1.270 UI/ml) COM O MS2.....	153
FIGURA 63 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O CONTROLE INTERNO COMPETITIVO NA PCR "ONE STEP".....	155
FIGURA 64 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AMOSTRA DE HCV NA PCR "ONE STEP"	155
FIGURA 65 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O HCV COM O CONTROLE COMPETITIVO (0,041 PFU EQ).....	156
FIGURA 66 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O HCV COM O CONTROLE COMPETITIVO (0,008) PFU EQ.....	157
FIGURA 67 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO MS2 NA PCR "ONE STEP".....	158
FIGURA 68 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O HCV COM O MS2 (0,041 PF EQ).	158
FIGURA 69 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DA AMOSTRA E6 DO PAINEL OPTIQUANT COM O MS2	159

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO ENSAIO DE PCR PARA O MS2.....	50
TABELA 2 - "PRIMERS" E SONDAS USADOS NO ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL.....	82
TABELA 3 - "PRIMERS" R USADOS NA TRANSCRIÇÃO REVERSA DOS CONTROLES INTERNOS E DO HVC.....	82
TABELA 4 - "PRIMERS" USADOS NA PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX.....	85
TABELA 5 - COMBINAÇÕES DE "PRIMERS" USADAS PARA COMPROVAR A INSERÇÃO DO MS2 NO VETOR PET-47B(+)......	105
TABELA 6 - TITULAÇÃO DO MS2 PELA TÉCNICA DE CULTURA EM DUPLA CAMADA.....	114
TABELA 7 - PFU DO PADRÃO (CI-MS2) USADO NA QUANTIFICAÇÃO DO CIC.....	129
TABELA 8 - DADOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DO CIC EM RELAÇÃO AO CI MS2.....	131
TABELA 9 - C_{Ts} DE AMPLIFICAÇÕES INDIVIDUAIS DE CIC E DO HCV E PARA COMBINAÇÕES CIC/HCV.....	137
TABELA 10 - PFU(s) eq. DO CIC NAS DILUIÇÕES E NAS COMBINAÇÕES CIC + HCV.....	138
TABELA 11 - CARGA VIRAL E PFU eq. NAS COMBINAÇÕES HCV+CIC.....	141
TABELA 12 - PFU eq. DO CIC DA EXTRAÇÃO À PCR EM TEMPO REAL.....	142
TABELA 13 - CARGAS VIRAIS DO HCV DA EXTRAÇÃO À PCR EM TEMPO REAL.....	142
TABELA 14 - PFU DO MS2 NAS COMBINAÇÕES MS2/HCV.....	147
TABELA 15 - PFU E CARGA VIRAL NAS COMBINAÇÕES HCV/MS2.....	150
TABELA 16 - PFU DO MS2 DA EXTRAÇÃO À PCR EM TEMPO REAL.....	151
TABELA 17 - RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE PARA O CIC...	160
TABELA 18 - RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE PARA O MS2..	162

LISTA DE SIGLAS

a-HBc	-	Antígeno core do vírus da hepatite B
BHQ	-	Black Holer Quencher
CI	-	Controle Interno
CI MS2	-	Controle Interno MS2
CIC	-	Controle Interno Competitivo
CMV	-	Citomegalovírus
C _T	-	Threshold cycle
DNA	-	Ácido Desoxiribonucleico
DNase	-	Deoxyribonuclease
DNTP(s)	-	Desoxiribonucleosídeo Trifosfato
DO	-	Densidade óptica
EBV	-	Vírus Epstein-Barr
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
EIA	-	Enzimaimunoensaio
ELISA	-	Enzyme - linked immunosorbent assay
F	-	Forward
FAM	-	Carboxifluorescêina
HBsAg	-	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HBV	-	Vírus da Hepatite B
HCV	-	Virus da Hepatite C
HIV-1	-	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSV	-	Herpes simplex virus
HTLV	-	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
IPTG	-	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MDBK	-	Linhagem de célula do rim bovino
MGB	-	Minor Groove Binder
MgCl ₂	-	Cloreto de magnésio
NASBA	-	Amplificação Baseada na Sequência de Ácido Nucleico
NAT	-	Teste do Ácido Nucleico
NFQ	-	Non Fluorescent Quencher
PCR	-	Reação em Cadeia por Polimerase
PEG	-	Polietilenoglicol
PFU	-	Unidades Formadoras de Placas (Plaques forming unit)
PFU eq.	-	Unidades Formadoras de Placas Equivalentes
R	-	Reverso
RNA	-	Ácido Ribonucleico

RNase	-	Ribonuclease
RT-PCR	-	PCR com Transcrição Reversa
SAP	-	Shrimp Alkaline Phosphatase
SS	-	Sequência Sintética
T _m	-	Temperatura de "melting"
TMA	-	Amplificação Mediada por Transcrição
UI	-	Unidade Internacional
UNG	-	Uracyl-N-Glycosilase
UTR	-	Região não traduzida
VLP	-	Particles Like Virus
VZV	-	Varicella zoster vírus
X-gal	-	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HEPATITE C.....	3
1.1.1 Vírus da Hepatite C - HCV.....	3
1.1.2 Genótipos do Vírus da Hepatite C.....	6
1.1.3 Diagnóstico Laboratorial da Hepatite C.....	7
1.2 CONTROLE INTERNO.....	17
1.2.1 Controles Internos não Competitivos.....	21
1.2.2 Controles Internos Competitivos.....	25
1.3 BACTERIÓFAGOS.....	29
1.3.1 Estrutura e Morfologia dos Bacteriófagos.....	30
1.3.2 Bacteriófago MS2.....	31
1.3.2.1 Processo de Infecção do Bacteriófago MS2.....	35
1.3.2.2 Utilização do Bacteriófago MS2.....	36
2 OBJETIVOS	40
2.1 OBJETIVO GERAL DO PROJETO.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PROJETO.....	40
2.3 JUSTIFICATIVA.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 REAGENTES.....	44
3.2 SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	45
3.3 MEIOS DE CULTURA.....	45
3.4 ORGANISMOS.....	46
3.5 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS.....	46
3.6 AMOSTRAS ESTUDADAS.....	47
3.7 CONSTRUÇÃO DO CONTROLE INTERNO.....	48
3.8 RT PCR PARA O MS2.....	49
3.8.1 Desenho de Oligonucleotídeos para Amplificação do MS2.....	50
3.8.2 Transcrição Reversa do Genoma do MS2.....	50
3.8.3 Padronização da Reação de PCR para Amplificação do Genoma Inteiro do MS2	51
3.9 CORTE E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR.....	52

3.10 CONSTRUÇÃO DO VETOR pGEM [®] -T Easy - MS2	53
3.10.1 Vetor pGEM [®] - T Easy (Promega)	53
3.10.2 Ligação do Fragmento de PCR ao Vetor pGEM [®] - T Easy	54
3.10.3 Transformação em Bactérias Cálcio Competentes	55
3.10.4 Análise de Clones pela Técnica “Tooth Pick”	56
3.10.5 Preparação de Plasmídeo em Pequena Escala (Miniprep)	57
3.10.6 Comprovação da Construção do Plasmídeo pGEM [®] -T Easy - MS2 com Enzimas de Restrição.....	57
3.11 CONSTRUÇÃO DO VETOR pET-47b(+)- MS2.....	58
3.11.1 Sistema pET.....	58
3.11.2 Vetor pET-47b(+)......	59
3.11.3 Preparo do Vetor pET-47b(+)- Geração de “Blunt Ends”- Extremidades Cegas.....	60
3.11.4 Preparo do Fragmento - Genoma do MS2.....	61
3.11.5 Ligação pET-47b(+)- MS2.....	62
3.11.6 Transformação da Ligação pET-47b(+)- MS2.....	62
3.11.7 Preparação de Plasmídeo em Pequena Escala (Miniprep).....	63
3.11.8 PCR para Confirmação da Inserção do MS2 no pET-47b(+)......	64
3.11.9 PCR para Verificar a Orientação da Inserção no Plasmídeo.....	65
3.11.10 Sequenciamento do Vetor pET47b(+)- MS2.....	65
3.11.11 Transformação do Vetor pET-47b(+)- MS2 em BL21 (DE3)pLyss.....	65
3.12 MONTAGEM pET-47b(+)- MS2 - SEQUÊNCIA SINTÉTICA.....	66
3.12.1 Desenho da Sequência Sintética.....	67
3.12.2 Transformação pUC57-SS (pUC57 - sequência sintética).....	69
3.12.3 Obtenção de Plasmídeos pUC57- SS.....	69
3.12.4 Digestão do pUC57- SS com <i>Bam</i> HI	69
3.12.5 Digestão do Plasmídeo pET -47b(+)- MS2 com <i>Bam</i> HI.....	70
3.12.6 Ligação pET-47b(+)- MS2 - Sequência Sintética (pET-47b(+)- MS2 - SS)	71
3.12.7 Transformação pET-47b(+)- MS2 - SS.....	71
3.12.8 PCR para Triagem dos Clones com o Plasmídeo pET-47b(+)-MS2 - SS	72
3.12.9 PCR para Verificar a Orientação da Inserção da Sequência Sintética.....	72
3.12.10 Sequenciamento do pET47b(+)- MS2 - SS.....	73
3.12.11 Obtenção de Plasmídeos pET-47b(+)- MS2 - SS.....	73

3.12.12	<i>Transformação do pET-47b(+) - MS2 - SS em BL21(DE3)pLysS</i>	73
3.13	EXPRESSÃO DOS BACTERÍOFAGOS.....	74
3.13.1	Expressão dos Bacteriófagos em Pequena Escala.....	74
3.13.2	Expressão do Bacteriófago MS2 em Escala Maior.....	75
3.13.3	Expressão do CIC em Escala Maior.....	75
3.14	RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BACTERÍOFAGOS.....	75
3.15	TITULAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE BACTERÍOFAGOS.....	77
3.15.1	Preparo do Inóculo da Bactéria XL1-Blue.....	77
3.15.2	Preparo da Suspensão de XL-1-BLUE e Bacteriófagos.....	78
3.16	EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL.....	79
3.17	DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PCR EM TEMPO REAL.....	80
3.18	TRANSCRIÇÃO REVERSA: OBTENÇÃO DE cDNA PARA A PCR EM TEMPO REAL "TWO STEP".....	82
3.19	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL "TWO STEP" PARA O CONTROLE INTERNO COMPETITIVO, PARA O MS2 E PARA O HCV	83
3.20	REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX "TWO STEP".....	84
3.21	QUANTIFICAÇÃO DO CONTROLE INTERNO COMPETITIVO	85
3.22	IMPLEMENTAÇÃO DO USO DO CONTROLE INTERNO EM FORMATO "TWO STEP".....	86
3.22.1	Controle Interno Competitivo.....	87
3.22.2	MS2.....	88
3.23	REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX "ONE STEP".....	89
3.24	TESTE DE ESTABILIDADE.....	91
4	RESULTADOS	92
4.1	CONTROLE INTERNO COMPETITIVO.....	92
4.2	RT-PCR PARA O GENOMA DO BACTERÍOFAGO MS2.....	96
4.3	CONSTRUÇÃO DO VETOR pGEM® -T Easy - MS2.....	98
4.4	CONSTRUÇÃO DO VETOR pET47b(+) - MS2.....	102
4.5	CONTRUÇÃO pET-47b(+) - MS2 - SS.....	107
4.6	EXPRESSÃO DO CONTROLE INTERNO MS2 E DO CONTROLE INTERNO COMPETITIVO (MS2 RECOMBINANTE).....	112

4.7	OPTIMIZAÇÕES PCR EM TEMPO REAL “TWO STEP”.....	115
4.7.1	Controle Interno MS2 - Amplificação com SYBR® GREEN.....	115
4.7.2	Controle Interno MS2 - Amplificação com TaqMan®.....	116
4.7.3	Controle Interno Competitivo - Amplificação com SYBR®Green.....	121
4.7.4	Controle Interno Competitivo - Amplificação com TaqMan®.....	123
4.7.5	HCV - Amplificação com TaqMan®.....	126
4.8	QUANTIFICAÇÃO DO CONTROLE INTERNO COMPETITIVO.....	128
4.9	IMPLEMENTAÇÃO DO USO DO CONTROLE INTERNO EM FORMATO “TWO STEP”.....	132
4.9.1	PCR Multiplex ‘Two Step’ com o Controle Interno Competitivo.....	133
4.9.2	Avaliação Preliminar do Limite de Detecção da Técnica Multiplex com a Presença do Controle Interno Competitivo.....	141
4.9.3	PCR Multiplex “Two Step” para o HCV e o MS2.....	147
4.9.4	Avaliação Preliminar do Limite de Detecção da Técnica Multiplex com a Presença do Controle Interno não Competitivo.....	150
4.10	OPTIMIZAÇÕES PCR EM TEMPO REAL “ONE STEP”.....	154
4.10.1	PCR Multiplex “ONE STEP” com o Controle Interno Competitivo.....	154
4.10.2	PCR Multiplex “ONE STEP” com o MS2.....	157
4.11	ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	159
4.11.1	Estabilidade do CIC.....	160
4.11.2	Estabilidade do Controle Interno MS2.....	161
5	DISCUSSÃO	164
6	CONCLUSÃO	174
7	PERSPECTIVAS	177
8	REFERÊNCIAS	178

1 INTRODUÇÃO

A hepatite C é uma doença infecciosa que se tornou um dos maiores problemas de saúde pública no mundo por apresentar uma alta taxa de morbidade e mortalidade e ser uma das principais causas de indicação para transplante hepático. A infecção causada pelo vírus da hepatite C (HCV) é comumente assintomática, apresenta uma elevada taxa de cronicidade e pode evoluir para cirrose e carcinoma hepatocelular. Desta forma um diagnóstico preciso é essencial e para suprir esta necessidade metodologias sorológicas e moleculares têm sido usadas.

As metodologias moleculares quantitativas para o vírus da hepatite C hoje são ferramentas essenciais para monitoração de tratamentos enquanto que as qualitativas com limite de detecção de 5 a 10 UI/ml, são utilizadas para determinar níveis baixos de viremia em pacientes hemodializados e imunodeprimidos, na identificação precoce de doadores de sangue contaminados com HCV e que não desenvolveram títulos de anticorpos detectáveis nos testes sorológicos e para acompanhamento de pacientes em estágio final de tratamento.

Em geral estas metodologias se compõe de diversas fases. A primeira delas é o isolamento do ácido nucleico a ser pesquisado e sua purificação com o objetivo de remover substâncias que possam representar potenciais inibidores do teste. Estes métodos têm uma forte influência na exatidão e reprodutibilidade da técnica e normalmente são combinados com uma tecnologia de amplificação cujos desenhos têm por objetivo obter muitas cópias do ácido nucleico alvo. Além disto no seu desenvolvimento deve-se considerar também o limite de detecção de cada alvo e a inclusão de medidas que possam minimizar os riscos de contaminação. Estas metodologias têm sido desenvolvidas baseando-se em técnicas como a RT-PCR clássica, na amplificação do sinal ou técnica do branched-DNA (b-DNA) e ultimamente na técnica do RT-PCR em tempo real que é um método que combina alta sensibilidade com um amplo limite de detecção permitindo também a quantificação da carga viral.

Estas metodologias compreendem ainda uma terceira fase que é a detecção do analito amplificado que pode ser feita usando estratégias como coloração com brometo de etídeo, hibridização com sondas marcadas e a utilização de sondas fluorescentes. Portanto os resultados gerados pelos testes moleculares dependem

do desempenho de diversos reagentes, instrumentos e operações que podem torná-los suscetíveis à ocorrência de resultados falso-positivos ou falso-negativos, que podem comprometer o diagnóstico e o tratamento de pacientes. Os resultados falso-positivos resultam principalmente da contaminação cruzada entre amostras ou produtos da própria reação e podem ser evitados pela prevenção química com "UNG" (Uracil -N-Glicosilase), que destrói amplicons de reações anteriores feitas usando a base deoxiuridina ao invés da timina, divisão do laboratório em áreas próprias destinadas a manipulação de reagentes, extração de ácidos nucleicos; amplificação e detecção. Utilização de boas práticas laboratoriais, de luz ultra-violeta para descontaminação de materiais e das salas e também de métodos como a PCR em tempo real que é feita em sistema fechado no qual os analitos são amplificados e detectados simultaneamente durante a reação não havendo a necessidade de se abrir os tubos, eliminado a possibilidade de contaminação decorrente desta fase. Porém é também essencial a adoção de sistemas efetivos que evitem resultados falso-negativos e que assegurem a qualidade e o controle dos testes de diagnóstico molecular conferindo confiança aos resultados gerados por uma metodologia. Neste sentido os controles internos têm sido utilizados com grande eficiência.

Estes controles podem ser fragmentos de DNA ou RNA que são introduzidos nas amostras clínicas com o objetivo de monitorar todos os procedimentos, a que uma amostra é submetida. São uma segunda molécula alvo que pode ser extraída, amplificada e distinguida de outros produtos em um mesmo tubo de reação, monitorando assim todos os reagentes, a funcionabilidade dos equipamentos, os procedimentos laboratoriais, garantindo a precisão do ensaio e conferindo ao teste um nível aceitável de confiabilidade para a ausência de resultados falso-negativos. Por isso um teste ideal deve sempre incluir um controle interno.

Diversas estratégias têm sido propostas para o desenho desses controles internos. Neste trabalho nós desenvolvemos dois controles internos derivado do bacteriófago MS2. O primeiro é o MS2 recombinante que é específico para o HCV, destituído de capacidade replicativa, inócuo para o ser humano e que pode ser produzido em um sistema controlado. O segundo é o próprio MS2 obtido via plasmídeo. Ambos exibiram bom desempenho quando testados em uma reação de PCR em tempo real desenhada para o vírus da hepatite C. Estes controles apresentaram também excelente estabilidade quando mantidos a 4^o C, condição esta bastante vantajosa para o manuseio e o transporte de reagentes de produtos diagnósticos.

1.1 HEPATITE C

Durante quase duas décadas, as hepatites que não puderam ser diagnosticadas por meio dos marcadores sorológicos das hepatites A e B foram catalogadas como hepatites por vírus não A, não B. Estas hepatites em geral evoluíam para formas crônicas sem que se pudesse estabelecer o(s) agente(s) etiológico(s) envolvido(s). Mais comumente o aparecimento destas hepatites era pós-transfusional ou esporadicamente.

O vírus da hepatite C (HCV) foi identificado por (CHOO *et al.*, 1989). Sabe-se hoje que mais de 90% das hepatites por vírus, anteriormente rotuladas de não A, não B, é causada pelo HCV.

Atualmente a hepatite C representa um grave problema de saúde pública; 170 milhões de pessoas no mundo estão infectadas (2). Em geral é uma doença assintomática em que 70 a 80% dos infectados tornam-se portadores crônicos e muitos destes irão apresentar uma progressão lenta da doença. Estes portadores crônicos e progressivos de hepatite C significam morbidade e mortalidade e são uma das principais causas de cirrose e cancer hepático. Soma-se a isto o fato de que as terapias que têm sido usadas, embora apresentem bons resultados para alguns pacientes têm eficácia limitada para outros e o desenvolvimento de uma vacina efetiva não está iminente.

1.1.1 Vírus da Hepatite C - HCV

O HCV é um vírus com tropismo primário pelo tecido hepático e que pertence a família Flaviviridae, gênero *Hepacivirus*. Sua partícula é esférica e constituída por um genoma de RNA, contido em um capsídeo icosaédrico, que contém uma envoltura lipoprotéica.

O genoma do HCV consiste de uma única molécula linear de RNA de aproximadamente 9,6 Kb. No interior do vírion, a molécula encontra-se super enrolada formando uma estrutura terciária complexa.

O genoma é constituído por três regiões distintas: uma região 5' não codificante, uma única fase de leitura aberta ("open reading frame") e uma região 3' não codificante (9). A região 5' apresenta uma região, com uma estrutura em forma de alça que está envolvida na replicação do HCV, e outra com um sítio para a ligação do ribossomo e tradução da poliproteína. A fase de leitura aberta têm mais de 9.000 nucleotídeos e compreende quase todo o genoma, sendo traduzida em uma poliproteína precursora, que contém 3.010 a 3.033 aminoácidos e que é secundariamente clivada por proteases celulares e virais para dar origem às proteínas estruturais (a proteína core do capsídeo e as duas glicoproteínas envelope E1 e E2), o polipeptídeo p7 e as proteínas não estruturais do vírus (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B) (EROGLU, C. *et al*, 2000, PENIN, *et al.*, 2004 e DUBUISSON, *et al.*, 2007).

A proteína core é uma proteína de ligação ao RNA. Unidades repetitivas desta proteína, conhecida como antígeno core do HCV formam o capsídeo icosaédrico do vírus, cujos mecanismos de montagem são pouco conhecidos. Estudos têm atribuído ao core a função de interagir com diversas proteínas celulares e influenciar numerosas funções na célula hospedeira.

As glicoproteínas E1 e E2 estão contidas na camada lipoprotéica do capsídeo e são proteínas transmembrana (MAYO *et al.* 2005). Estas proteínas constituem o envelope do vírus e têm funções em diferentes pontos do ciclo de vida do HCV. Elas são essenciais para a entrada do vírus nas células e participam na montagem das partículas infecciosas. E1 e E2 são componentes virais presentes na superfície das partículas do HCV e, portanto são candidatas a serem ligantes de receptores celulares.

O polipeptídeo p7 está localizado dentro da poliproteína, na junção entre as proteínas estruturais e não estruturais. Este polipeptídeo não é requerido para a replicação do RNA, e é incerto se ele é um componente do vírion, porém têm sido apresentado que o p7 é essencial para a infectividade do HCV em chipanzés e que este polipeptídeo pode ter atividade de canal de íons em membranas lipídicas artificiais.

NS2 têm atividade de protease e está envolvida no processamento da poliproteína sendo responsável pela clivagem da junção NS2 e NS3. Quando separada da poliproteína sua função é desconhecida.

NS3 é uma proteína multifuncional com função de serina protease na região N-terminal e função RNA helicase/NTPase na região C terminal. A atividade de protease de NS3 é aumentada pelo cofator NS4A. A função da NS3 helicase não é

conhecida no contexto do ciclo de vida do HCV. Ela pode contribuir no processo de replicação, removendo estruturas secundárias ou proteínas que possam interferir na síntese do RNA. Estudos demonstraram também que essa proteína interage com várias proteínas celulares, e pode estar envolvida no processo de carcinogênese. Entretanto a relevância destas interações precisam ser confirmadas no contexto dos sistemas de cultivo celular recentemente desenvolvidos para o HCV.

NS4B é uma proteína com papel na alteração da membrana e na formação do complexo de replicação do HCV.

NS5A é uma proteína essencial na replicação do genoma viral e que interage com NS5B. Esta interação é essencial para a manutenção de replicons em células Huh-7. NS5A é uma proteína fosforilada de considerável interesse devido ao seu potencial em modular a resposta ao interferon. Também têm sido apresentado que esta proteína interage com diversos componentes celulares, sinalizando diversas vias.

NS5B é uma RNA polimerase dependente de RNA essencial na replicação do RNA do HCV em cultivo celular. A atividade desta enzima parece ser modulada por interações com outras proteínas virais.

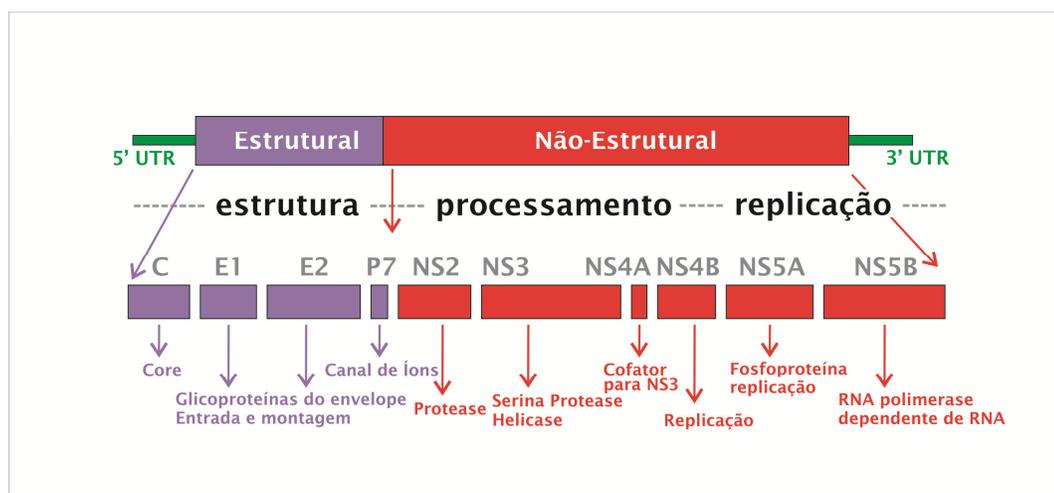


FIGURA 1 - ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DO HCV

FONTE: Expert Reviews in Molecular Medicine, 2003, Cambridge University

A caracterização do genoma e das estruturas e funções dos produtos dos genes facilitaram o entendimento do ciclo de vida viral e da patogênese da doença

associada ao HCV e certamente contribuirão para o desenvolvimento de vacinas efetivas e melhores terapias.

1.1.2 Genótipos do Vírus da Hepatite C

Uma característica do HCV é a grande diversidade de sequências presentes em seu genoma, o que dificulta o desenvolvimento de reagentes, vacinas e de novas intervenções terapêuticas.

Esta diversidade deve-se ao fato de que a RNA polimerase codificada pelo vírus da família Flaviviridae não têm função “proof reading”. São enzimas com carência de mecanismos de correção de erros. Em consequência a replicação do genoma do vírus é caracterizada por taxas de erros de 1 em 100.000 a 1 em 10.000 bases. Soma-se a isto o fato de que o HCV possui uma taxa de replicação estimada em 10^{12} vírions por dia. Por consequência origina-se uma população com alta variabilidade genética e com muitas mutações, ou seja, vírus heterogêneos, mas muito próximos dentro de um mesmo hospedeiro, chamados de quasispécies. Muitas mutações geradas são desvantajosas ou mesmo deletérias para o vírus e estas variantes são eliminadas no processo de seleção negativo. Entretanto algumas mutações podem não ter impacto na capacidade de replicação e algumas podem ser benéficas conferindo vantagens à mesma (TIMM *et al.*, 2007).

Para estudar esta diversidade foi sequenciado o genoma inteiro de numerosas cepas do HCV, de várias regiões geográficas do mundo. Análises destas sequências mostraram consideráveis variações. Regiões do genoma como E1 e E2 são altamente variáveis, enquanto outras como a região 5' não codificante contém domínios invariáveis que são importantes para a iniciação e controle da tradução da poliproteína. Esta têm sido a região de escolha para o desenvolvimento de testes qualitativos e quantitativos para a detecção do HCV. Por outro lado este alto nível de conservação, é limitante para distinguir os genótipos 1 e 6 e subtipos dentro dos genótipos 1, 2, 3, 4 e 6. As regiões core E1 e NS5B, têm sido usadas com este propósito (SIMMONDS *et al.*, 1994 e MURPHY *et al.*, 2007).

As variações observadas ao longo de todo o genoma ou de fragmentos genômicos de cepas de HCV procedentes de diferentes regiões do mundo serviram

para classificar o HCV em seis grupos principais ou genótipos: 1, 2, 3, 4, 5, 6 e subtipos dentro destes genótipos. Cerca de 70 subtipos diferentes estão descritos. Os genótipos diferem um do outro aproximadamente 31-33% nas sequências de nucleotídeos. Os subtipos distintos podem diferir cerca de 20-25% (SIMMONDS *et al.*, 1994), enquanto que uma diferença de aproximadamente 5-8% é observada dentro de um único subtipo e 1% de diferença entre genomas de HCV de um mesmo indivíduo (KATO *et al.*, 2009).

A existência de diferentes genótipos de HCV pode ser correlacionada com diferentes características clínicas associadas à infecção. Estas variações nas manifestações clínicas refletem diferenças na patogenicidade dos diferentes tipos de vírus. Indivíduos com o genótipo 2 e 3, respondem melhor ao tratamento que indivíduos com genótipo 1. Portanto a determinação do genótipo é fundamental no prognóstico e manejo dos pacientes quanto ao tempo de tratamento.

Segundo estudos as quasispecies podem estar relacionadas com o mecanismo de escape do sistema imune do hospedeiro e também podem ser um fator predictivo para a sensibilidade a terapia por interferon (BUSEK *et al.*, 2003).

Esta variabilidade de sequências encontradas entre os genótipos de HCV podem afetar também a antigenicidade de muitos epítomos e talvez esta seja uma das explicações para os resultados falso-negativos suscetíveis de ocorrer nos testes sorológicos. Cepas de HCV com extremas variações de sequências são capazes de gerar anticorpos com reatividade variada ou sem nenhuma reatividade com os antígenos e peptídeos usados nestes testes.

Os diferentes genótipos do HCV estão distribuídos em diferentes regiões geográficas. Genótipos 1, 2 e 3 são predominantemente encontrados na Europa, Japão e Estados Unidos. Genótipo 4 na África Central e do Norte, o genótipo 5 na África do Sul e o genótipo 6 no sudoeste da Ásia. No Brasil predominam os genótipos 1, 2 e 3 (BUSEK *et al.*, 2003)

1.1.3 Diagnóstico Laboratorial da Hepatite C

Os testes diagnósticos para a hepatite C baseiam-se em duas categorias: testes sorológicos que detectam anticorpos contra o vírus da hepatite C (anti-HCV) e

testes que podem detectar, quantificar ou caracterizar componentes das partículas virais, tais como RNA do HCV e antígeno core.

Os primeiros testes sorológicos para o vírus da hepatite C datam de 1989, quando foi identificado o genoma do vírus, e se basearam no formato de ELISA (enzimaimunoensaio) (GERMER *et al.*, 2001). A primeira geração de testes anti-HCV continha um único antígeno recombinante derivado do gene da região não estrutural NS4, designado c100-3. O desenvolvimento deste teste foi muito importante para identificar pacientes com evidências sorológicas de infecção por HCV e para reduzir a transmissão do vírus por transfusão sanguínea. Porém este teste tinha uma sensibilidade em torno de 80% e apresentava uma alta taxa de falso-positivos e por isso foi subseqüentemente substituído, em 1992 pelos testes Elisa de 2ª geração.

O Elisa de 2ª geração continha as proteínas recombinantes c22-3, derivada da região core, e c33-c, derivada da região não estrutural NS3. A proteína c33-c foi fusionada com o antígeno c100-3 para formar a proteína c200. A introdução destes antígenos nestes testes gerou uma substancial melhora na sensibilidade e um aumento na especificidade em relação ao ELISA de primeira geração. O uso destes antígenos também encurtou o período de janela imunológica de 16 para 10 semanas. Este teste permitiu a detecção de aproximadamente 95% dos indivíduos acometidos pelo vírus da hepatite C, porém falhava para detectar anticorpos em indivíduos imunocomprometidos e em pacientes com HIV.

O teste ELISA de terceira geração contém antígenos derivados da região NS3 do genoma, antígeno core, e um antígeno adicional da região NS5. Portanto estes testes detectam misturas de anticorpos dirigidos contra vários epítopes do HCV. Estudos baseados no seu uso indicaram um aumento substancial na sensibilidade para detectar infecção por HCV em doadores de sangue e em pacientes com problemas hepáticos e puderam mostrar que a sua utilização resultou em uma redução da janela imunológica de 82 para 66 dias (BARRERA *et al.*, 1995). Desta forma, devido às falhas ainda passíveis de ocorrer nestes testes, contínuos esforços têm sido feitos com o objetivo de se obter metodologias capazes de reduzir ainda mais este período de janela e de gerar resultados ainda mais confiáveis nas triagens em bancos de sangue, em situações de emergência como exposição de trabalhadores ao HCV em ambientes de trabalho e em triagens pré-transplante.

Recentemente têm sido apresentado que os níveis de antígeno core do HCV, correlacionam-se com os níveis de RNA que é o primeiro marcador detectável

no plasma de pacientes acometidos pelo vírus da hepatite C. Este antígeno durante a pré-soroconversão é detectado em média 1 a dois dias depois que o RNA é detectado nos testes atuais disponíveis (LAPERCHE *et al.* 2005). Utilizando este antígeno foram desenvolvidos dois testes ELISA. O primeiro detecta e quantifica o antígeno core do HCV podendo ser usado como um marcador de replicação viral. O segundo permite a detecção simultânea do antígeno core do vírus da hepatite C e de anticorpos anti- HCV (SCHNURIGER *et al.*, 2006, LAPERCHE *et al.*, 2005). Estes testes, portanto, têm sensibilidades próximas aos testes que detectam o RNA do vírus e podem reduzir a janela imunológica de 66 dias para 11 dias. Existem duas versões de testes comerciais para detecção simultânea do core e do anti-HCV, disponíveis para serem utilizados. Estes testes têm sido escolhidos como uma alternativa aos testes baseados em biologia molecular para diagnóstico no início da infecção.

Os imunoblot foram desenvolvidos para ajudar a resolver resultados falso-positivos obtidos nos ELISA. Estes testes também detectam anticorpos específicos, usando antígenos virais individualmente fixados em uma fita de nitrocelulose. Reações positivas são caracterizadas pelo aparecimento de bandas coloridas em posições específicas da tira, e a interpretação pode ser visual ou automatizada. Atualmente, os imunoblots tornaram-se obsoletos devido a boa performance dos testes de terceira geração, que têm uma especificidade maior que 99%. Além disto, estes vem sendo substituídos pelos testes moleculares.

Os testes moleculares detectam diretamente a presença do RNA do HCV usando uma combinação de técnicas de amplificação e detecção. Exceto para certas situações clínicas incomuns estes testes têm suplantado os imunoblots como teste preferido para confirmar a infecção pelo HCV. Os testes moleculares podem ser qualitativos ou quantitativos.

Os testes moleculares qualitativos são importantes ferramentas porque são os que apresentam maior sensibilidade de todos os disponíveis. Estes testes informam a presença ou não do RNA viral (resultado positivo ou negativo), por isso são usados para confirmar viremia, especialmente baixos níveis de viremia, triar doadores de sangue, diagnosticar hepatite C aguda, predizer aos pacientes o risco de relapso virológico após tratamento, identificar pacientes com hepatite crônica que são negativos para a presença de anti-HCV (pacientes em hemodiálise ou submetidos a transplante), diagnosticar pacientes anti-HCV positivos, mas com

aminotransferases normais e resolver resultados sorológicos indeterminados (BRANDÃO *et.al.* 2001).

Os testes de detecção qualitativa comerciais são baseados no princípio da amplificação do alvo usando metodologias como a amplificação mediada por transcrição (TMA), reação em cadeia por polimerase clássica com transcrição reversa (RT-PCR), ou PCR em tempo real (KRAJDEN, 2002). O valor de corte do limite inferior de detecção do RNA destes ensaios comerciais é de 50 UI/ml, 10 UI/ml e 15 UI/ml respectivamente (CHEVALIEZ *et al.*, 2007, Scott *et al.* 2007). Muitos "métodos in house" baseados em PCR têm sido descritos na literatura e têm provado ter utilidade clínica.

Na amplificação mediada por transcrição (TMA), genomas virais que estão presentes em amostras clínicas são capturados por partículas magnéticas ligadas à oligonucleotídeos que hibridizam-se especificamente com a região 5' UTR do HCV. O RNA do HCV é copiado em uma fita de RNA anti-sense durante um processo isotérmico usando duas enzimas a transcriptase reversa e a T7 RNA polimerase. Os produtos de amplificação do RNA são detectados por sinal quimioluminescente.

Nas técnicas de amplificação do alvo, um grande número de cópias virais (amplicons), são amplificados em uma reação enzimática cíclica. Os amplicons podem ser detectados por vários métodos e a quantidade de genomas virais presentes na amostra clínica podem também ser quantificados. O método da reação em cadeia por polimerase (PCR) usa várias temperaturas e a enzima termoestável, DNA polimerase. Uma fase de transcrição reversa inicial é necessária para vírus RNA como o HCV, visando a síntese do DNA de dupla fita complementar (c-DNA), que é usado como molde na PCR. Os amplicons, DNA de dupla fita, são detectados somente ao término da reação, usando sistemas de detecção tradicionais como eletroforese dos ácidos nucleicos na presença de brometo de etídeo e análise das bandas por irradiação ultra-violeta, hibridização com sondas marcadas (Southern blot), ou por captura do amplicon em uma fase sólida usando "primers" ou sondas marcadas com biotina ou digoxigenina ou incorporando-se digoxigenina diretamente no amplicon. Uma vez capturado o amplicon pode ser detectado usando avidina marcada com enzima ou uma molécula anti-digoxigenina (MACKAY, *et al.*, 2002).

No sistema de PCR em tempo real, a quantidade de produto formada é determinada durante o curso da amplificação por monitoramento da fluorescência dos corantes ou sondas marcadas com fluoróforos que são introduzidos na reação e que

se ligam ao produto amplificado e reportam a sua presença emitindo fluorescência. Desta forma, o aumento do sinal fluorescente é diretamente proporcional a quantidade de produto de PCR na reação.

A emissão de fluorescência é registrada em cada ciclo e por isso é possível monitorar a reação de PCR durante a fase exponencial. Nesta fase o primeiro aumento significativo na quantidade de produto de PCR correlaciona-se com a quantidade inicial do ácido nucleico alvo. Um número de cópias maior que a do ácido nucleico alvo poderá ser observado tão logo se verifique um aumento significativo na fluorescência acima da linha base, e não somente após o término da reação, como ocorre na reação de PCR clássica (DORAK *et al.*, 2009). Diversos tipos de moléculas fluorescentes podem ser empregadas na detecção. Neste desenvolvimento utilizou-se o sistema TaqMan e SYBR Green®.

A PCR utilizando o sistema TaqMan, além dos componentes tradicionais de uma reação de PCR convencional, como tampão Tris-HCl, MgCl₂, dNTP(s), Taq DNA polimerase e "primers", requer um terceiro oligonucleotídeo (sonda TaqMan), com sua extremidade 5' ligada a um fluoróforo "reporter" e sua extremidade 3' a uma molécula "quencher", capaz de por um fenômeno físico denominado FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo "reporter" após este ter sido estimulado por luz de comprimento de onda específico (DORAK *et al.*, 2006). Essa transferência de energia se dá eficientemente somente em distâncias muito curtas e diminui rapidamente quando o "reporter" e o "quencher" são separados.

Desta forma durante a reação de PCR ocorre a hibridização dos "primers" e da sonda e durante a fase de extensão, a sonda que estava anelada à sua sequência complementar é degradada devido à atividade 5'-3' exonuclease da enzima Taq DNA polimerase, e as moléculas "reporter" e "quencher" são separadas. Isto extingue o FRET e faz com que a fluorescência do "reporter" deixe de ser captada pelo "quencher" e passe a ser detectada pelo sistema ótico do equipamento de PCR em tempo real. Existe uma correlação linear entre o número de moléculas "reporter" liberadas e o número de amplicons formados durante cada ciclo da PCR. Desta forma a intensidade da fluorescência emitida é proporcional à quantidade do produto específico presente dentro de cada tubo de ensaio em cada ciclo da reação. A Figura 2 mostra o processo de amplificação no sistema TaqMan.

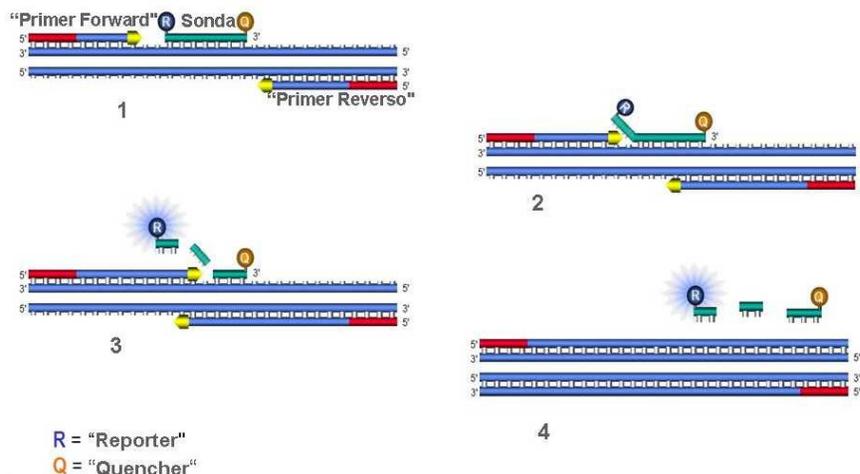


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS DE UMA PCR EM TEMPO REAL COM TaqMan

FONTE: NOVAIS *et al.* (2004)

NOTA: 1 etapa de anelamento dos "primers forward" e reverso e da sonda a sequência alvo após a desnaturação;
2 e 3: etapa de alongamento com a hidrólise da sonda que permite a emissão da fluorescência do "quencher", que é detectada e registrada a cada ciclo;
4: término da fase de extensão.

Na etapa de alongamento, a hidrólise da sonda permite a emissão da fluorescência do "reporter", que é então detectada e registrada a cada ciclo de amplificação.

As sondas TaqMan podem ser marcadas com moléculas "quencher" fluorescentes como TAMRA ou com moléculas "quencher" não fluorescentes como o BHQ1 (*black hole quencher*). Estão disponíveis também as sondas Taqman MGB, que são oligonucleotídeos curtos marcados com grupamentos químicos MGB - *Minor Groove Binder*, que formam duplex extremamente estável com a sequência complementar. Essa modificação química provoca um aumento grande na T_m (*melting temperature*) destes oligos, permitindo a utilização de sequências mais curtas para obter sondas com T_m (s) mais elevados, o que aumenta a afinidade da sonda hibridizada pelo DNA. Além disto sondas mais curtas implicam em uma proximidade maior entre o "reporter" e o "quencher", o que aumenta a eficiência de transferência de energia entre estes fluoróforos, diminuindo o ruído do ensaio. Estas sondas contêm "quencher" que não emite fluorescência como o NFQ (*Non Fluorescent Quencher*), liberando um dos canais de fluorescência do equipamento. Este melhoramento técnico elimina eventuais sobreposições espectrais com a

fluorescência do “reporter”, o que leva a uma maior acurácia na captação do sinal específico do “reporter” e permite trabalhar com mais fluoróforos simultaneamente. Outra vantagem é que ao sintetizar-se sondas mais curtas, a qualidade destas também melhora por diminuir o número de ciclos de síntese necessários na PCR em tempo real.

Na estratégia de PCR em tempo real com o SYBR Green® o corante liga-se entre a fita dupla de DNA e emite uma grande quantidade de sinal fluorescente que é registrada pelo sistema óptico do termociclador. Esta emissão de luz é proporcional ao número de fragmentos amplificados na PCR e também ao tamanho destes fragmentos em pares de bases. Quanto maior o fragmento maior será o número de moléculas SYBR Green® intercaladas.

A mistura da reação neste sistema contém o ácido nucleico, os componentes de uma reação de PCR, os "primers" e o SYBR Green®. As moléculas de SYBR Green® não ligadas apresentam fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo, sendo este subtraído durante a análise do computador. Durante a polimerização catalisada pela enzima Taq DNA polimerase, as moléculas do SYBR Green® vão se ligando ao DNA recém sintetizado. Assim a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observada em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação do DNA, as moléculas do corante são liberadas e há queda no sinal de fluorescência. A detecção da fluorescência no final da etapa de extensão de cada ciclo de PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado.

O sistema SYBR Green® é mais flexível que o sistema TaqMan, porque pode ser usado com qualquer par de "primers" sem a necessidade de sintetizar uma sonda fluorescente, porém é menos específico porque haverá detecção de todo e qualquer amplicon, inclusive artefatos como amplificações inespecíficas e "primer dimers", dificultando a análise, principalmente de alvos com baixo número de cópias. No sistema TaqMan haverá detecção da amplificação apenas quando existem sítios de anelamento para os "primers" e para as sondas entre eles.

O sistema SYBR Green® também não permite a realização de reações multiplex, pois não há como identificar separadamente os sinais fluorescentes de amplicons diferentes. No entanto com este sistema é possível realizar um controle de amplificações inespecíficas automaticamente, sem a necessidade de fazer uma verificação em eletroforese, o que não é possível se realizar com o TaqMan. Esse

controle se faz através de uma curva de dissociação e utiliza-se da característica do SYBR Green® de emitir fluorescência apenas quando o DNA encontra-se em dupla fita. Ao final de uma amplificação, programa-se o equipamento para fazer um aumento gradual de temperatura, de 60°C para 95°C, durante um período de tempo de 20 minutos, com constante leitura da fluorescência. Quando se atinge uma temperatura igual à T_m do amplicon, observa-se uma queda abrupta do sinal. Esse fenômeno deve ser observado apenas uma vez durante a análise da dissociação, indicando que ocorreu a amplificação de apenas um alvo e eliminando, portanto, a possibilidade de ocorrência de amplificações inespecíficas.

Portanto, com este controle, esta metodologia pode ser usada com as mesmas vantagens que a sonda no que concerne à rapidez de obtenção dos resultados, redução das chances de ocorrência de contaminação cruzada e possibilidade de quantificação do material adicionado à reação. O fato da utilização do SYBR Green® eliminar a necessidade de uso da sonda facilita o desenho do ensaio e reduz seus custos. Esta metodologia pode ser usada também como uma ferramenta auxiliar aos sistemas que utilizam sonda TaqMan, uma vez que permite uma avaliação da especificidade dos "primers" que estão sendo utilizados.

O sistema TaqMan têm sido muito utilizado no desenvolvimento de testes moleculares quantitativos que detectam os níveis de RNA do HCV, ou a carga viral no soro ou no plasma e refletem as taxas de replicação e de eliminação do vírus pelo hospedeiro e são de fundamental importância no gerenciamento de pacientes submetidos a tratamento (BRANDÃO *et al.*, 2001). Comparação dos níveis de material genético do HCV antes e durante o tratamento é importante para identificar pacientes não respondedores, ou seja, que não apresentaram uma diminuição da carga viral de 2 logs após 12 semanas de tratamento, indicando que a terapia não está sendo eficiente e não deve ser continuada (GUILLEMETTE *et al.*, 2009).

Além das técnicas baseadas na PCR em tempo real para quantificar o HCV estão disponíveis outras que se baseiam na técnica de amplificação do sinal, branched-DNA (b-DNA) e também na RT-PCR clássica.

No teste do b-DNA o RNA do HCV é liberado por lise química do vírion e é diretamente hibridizado em poços de captura ligados com sondas específicas. O sinal obtido é amplificado por sucessivas hibridizações com sondas, que são sequencialmente adicionadas na reação, formando o complexo branched DNA. Sondas marcadas com fosfatase alcalina são adicionadas e hibridizam-se ao b-DNA.

Incubação do complexo com um substrato garante a detecção que baseia-se na degradação do substrato pela fosfatase alcalina com emissão de sinal quimioluminescente que é registrado. Quantificação é baseada em uma curva padrão gerada simultaneamente usando padrões conhecidos (PODZORSKI, *et al.*, 2002).

A quantificação usando as técnicas de RT-PCR clássica baseia-se na amplificação competitiva do alvo viral, juntamente com uma quantidade conhecida de um padrão sintético adicionado a cada tubo de reação. As quantidades relativas do alvo viral e dos amplicons do padrão são determinadas ao término do procedimento.

Os métodos de PCR em tempo real para quantificar RNA do HCV, representam um avanço muito importante uma vez esta técnica é mais sensível que as técnicas de PCR convencionais e é menos suscetível a contaminações, uma vez que não requer o processamento pós-PCR (WATZINGER *et al.* 2005). As quantidades do alvo e dos padrões são determinadas durante a amplificação e os resultados são lidos em uma curva padrão estabelecida em paralelo. Seus limites de quantificação são consistentemente maiores, tornando-a particularmente útil para quantificar amplos limites de cargas virais, observados em pacientes tratados e não tratados com infecção pelo HCV. Isto evita a necessidade da diluição do amplicon antes da detecção convencional ou de se repetir o teste usando amostra diluída, porque a carga viral da amostra encontra-se fora dos limites do teste. Além disto esta técnica possui um baixo coeficiente de variação inter-ensaio e intra-ensaio e pode ser usada em plataformas automatizadas combinando extração e amplificação.

Dois tipos de quantificação podem ser realizadas usando esta metodologia, a relativa e a absoluta. Na quantificação relativa, as amostras são quantificadas relativamente umas às outras. Na quantificação absoluta, obtém-se valores numéricos de uma amostra desconhecida com alguma unidade, como número de cópias ou nanogramas de DNA, comparando-se com uma amostra conhecida (BUSTIN *et al.*, 2002).

Em testes diagnósticos que visam estabelecer a carga viral, a quantificação absoluta é possível usando-se padrões devidamente quantificados que são testados concomitantemente com as amostras cuja carga viral se quer determinar. A amplificação destes padrões geram curvas-padrão que permitem a determinação do número de cópias do alvo de interesse. Resultados são tipicamente mostrados como plots de amplificação que resultam de uma série de determinações fluorescentes

obtidas em cada ciclo, durante todo o processo de amplificação, inclusive das fases iniciais. Isto facilita a quantificação do alvo na fase exponencial da PCR, quando o primeiro produto de amplificação torna-se detectável. PCR em tempo real otimizada apresenta alta sensibilidade. Atualmente estão disponíveis testes comerciais que podem detectar 25 UI/ml e 50 UI/ml, (GUILLEMETTE *et al*, 2009).

Uma grande evolução que ocorreu nestes testes foi a padronização das unidades de quantificação do HCV. Durante muitos anos as unidades usadas nos vários testes quantitativos não representavam as mesmas quantidades de RNA nas amostras clínicas. Por este motivo foi estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization -WHO), o primeiro Padrão Internacional para o RNA do HCV (SALDANHA, *et al.*, 1999), com o objetivo de padronizar uma unidade de quantificação para o RNA deste vírus. Uma UI para o RNA do HCV foi arbitrariamente definida usando este padrão. Ela não representa o número de partículas virais em uma amostra, mas a quantidade de RNA do HCV. Todos os testes comerciais quantitativos para o RNA do HCV, disponíveis atualmente usam preferencialmente UI, garantindo uma padronização dos resultados gerados por diferentes testes, e esta deve ser a unidade de escolha entre as disponíveis. Esta padronização simplifica o acompanhamento de pacientes infectados, possibilitando uma comparação fácil dos níveis de viremia do HCV, independente do teste utilizado. Todos os testes comerciais disponíveis incluem um padrão interno ou um painel de quantificação externo, quantificado contra o painel internacional.

No estabelecimento deste padrão uma amostra liofilizada do genótipo 1 foi aceita como padrão candidato, e no estudo realizado esta amostra foi quantificada como tendo 10 e 5 UI/ml. Este padrão internacional foi distribuído em frascos contendo 50.000 UI/ml em forma liofilizada e têm sido usado para calibrar a concentração de RNA do HCV em painéis ou para expressar as cargas do RNA do HCV em UI/ml, em testes que têm sido desenvolvidos (PAWLOTSKY *et al.*, 2000).

Este padrão também especifica a sensibilidade mínima. O limite mínimo requerido é 50 UI/ml para testes quantitativos e tende a ser em torno de 15 UI/ml para os testes quantitativos por PCR em tempo real (GUILLEMETTE *et al*, 2009).

Além dos testes moleculares qualitativos e quantitativos têm sido desenvolvidos testes de genotipagem que são clinicamente importantes para definição e acompanhamento de tratamentos, porque eles predizem a chance de uma resposta anti-viral, ditam a duração da terapia. Pacientes com genótipos 2 e 3

são 3 a 6 vezes mais prováveis de obter uma resposta sorológica sustentável, e os pacientes infectados com o genótipo 1 podem se beneficiar de um tempo de terapia mais longo.

A determinação molecular dos genótipos do HCV pode ser feita pela análise direta da sequência genômica ou pela hibridização reversa com sondas de oligonucleotídeos genótipo específicas. Está disponível um produto comercial cujo princípio baseia-se na hibridização reversa, e que permite a determinação fácil e rápida dos seis genótipos e seus subtipos. O ensaio é baseado nas variações encontradas na região 5' não codificante de diferentes genótipos do HCV. O sequenciamento, considerado padrão ouro, também discrimina os tipos e subtipos do HCV com segurança. A metodologia comercial disponível está associada a um programa de computador para análise e comparação dos produtos de PCR amplificados e sequenciados.

1.2 CONTROLE INTERNO

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NATs) foram introduzidas no diagnóstico clínico no início de 1990, e algumas dificuldades foram sendo observadas. Estudos multicêntricos envolvendo o vírus da hepatite B (HBV), *Mycobacterium tuberculosis* e o vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1), evidenciaram problemas relacionados a especificidade (um índice de 40% de falsos-positivos), sensibilidade, grandes variações em resultados quantitativos e a utilização de diversas unidades nos resultados finais que não permitiam a comparação entre os mesmos.

Os problemas identificados mostraram a necessidade da utilização de reagentes padronizados, unidades comuns no resultado final dos diversos testes, adoção de mecanismos de controle de contaminação, desenvolvimento de métodos de isolamento de ácidos nucleicos mais práticos, utilização de testes com limites de detecção clinicamente significantes, utilização de controles internos. Enfim tornou-se evidente a necessidade da adoção de medidas de controle de qualidade com o objetivo de garantir a veracidade tanto dos resultados positivos como dos negativos (NIESTERS, *et al.* 2001 e NIESTERS, *et al.*,2002).

Nos testes por biologia molecular, como em outros testes diagnósticos, resultados falso-positivos podem ser gerados por erros humanos provenientes, por exemplo, de mistura de amostras, identificação incorreta de amostras e também podem ser decorrentes do próprio processo de amplificação e detecção ou ainda por contaminação.

A primeira fonte, os erros humanos, nunca podem ser completamente eliminados, porém podem ser minimizados, através de educação cuidadosa, treinamento e supervisão de pessoal.

A contaminação em um laboratório de biologia molecular pode ser proveniente de DNA genômico, espalhamento de aerossóis de amostras positivas e, principalmente, por amplicons produzidos em reações de amplificação que podem contaminar novas amostras clínicas, reagentes, acessórios ou instrumentos, e este único amplicon pode dar origem a um resultado positivo em uma amostra clinicamente negativa.

Uma das formas de prevenir este tipo de contaminação é a divisão das áreas de trabalho em três áreas distintas (BURKARDT *et al.* 2000). A primeira destinada para o preparo de reagentes, a segunda para o manuseio de todos os materiais clínicos e controles que precisam ser processados e a terceira para amplificação e subsequente detecção de amplicons. Estas áreas não devem ser adjacentes e podem situar-se em diferentes pisos ou mesmo em diferentes construções. O fluxo entre elas deve ser sempre unidirecional, não devendo haver troca de materiais e equipamentos entre as diferentes áreas. Outras medidas incluem a utilização de ponteiros com filtros e a inclusão de um controle negativo em cada bateria de testes realizada. Este controle pode ser a água. Se em uma corrida este controle negativo apresentar-se positivo, o teste inteiro deve ser invalidado e repetido. Se o problema persistir, existe uma grande possibilidade de uma contaminação geral no laboratório. Neste caso todos os reagentes devem ser descartados e preparados novamente e as salas devem ser descontaminadas com hipoclorito de sódio.

Atualmente a utilização da tecnologia de PCR em tempo real têm contribuído significativamente para reduzir contaminações por amplicons, uma vez que a detecção do produto amplificado é em tempo real no próprio equipamento e o tubo não precisa ser aberto para se fazer a detecção (MACKAY, *et al.*, 2004).

A introdução nas reações de PCR de um controle anti-contaminação baseado na atividade da “UNG” (uracil-N-glicosilase), é outra medida que têm sido adotada e que também têm contribuído na redução dos resultados falso-positivos decorrentes de contaminação (NEUMAIER, *et al.*, 1998). A idéia básica é marcar os amplicons que são produzidos durante o processo de amplificação, de modo que eles possam ser distinguidos do DNA alvo natural, o que é crucial para o reconhecimento de uma contaminação de uma amostra clínica com amplicons de uma corrida de PCR prévia. Tal marcação é feita, substituindo a base pirimídica T por U durante a amplificação do DNA, o que é possível colocando-se na reação deoxyuridina. Assim os fragmentos gerados na amplificação (amplicons), terão uracila e se presentes em uma segunda PCR, serão destruídos na fase de pré-amplificação. A atividade da UNG ocorre na fase de pré-amplificação. Antes de iniciar a ciclagem, a reação de PCR preparada com a enzima é submetida a aquecimento a 50° C, por 2 minutos. Durante este tempo a UNG procura e degrada todo DNA de fita dupla, contendo uracila. Os fragmentos de DNA ou RNA contendo timina permanecem intactos. Na sequência, a UNG é inativada, colocando-se a reação a 95°C, durante 10 minutos. Desta forma, evita-se que a UNG degrade os produtos da termociclagem que se iniciará em seguida. Este procedimento têm sido incluído em muitos testes diagnósticos.

Além dos resultados falso-positivos nos testes diagnósticos, também é possível a ocorrência de resultados falso-negativos, que podem ser causados por amostras degradadas, principalmente quando o ácido nucleico é RNA, suscetível à ação de RNases. Este processo pode ser evitado, garantindo-se condições de coleta, transporte e estocagem de amostras que assegurem a integridade do material a ser analisado (OAKEY, *et al.*, 2007).

A presença de inibidores na reação de amplificação, que podem impedir a atividade enzimática, é outro fator responsável pela geração de resultados falso-negativos. Muitos sistemas de extração de ácidos nucleicos utilizados atualmente permitem a extração e purificação simultânea de ácidos nucleicos. Estes sistemas baseiam-se na utilização de colunas revestidas com membranas de sílica que possuem propriedades seletivas de ligação. Desta forma, os ácidos nucleicos que ligam-se a estas colunas podem ser eficientemente lavados, antes da eluição, permitindo uma remoção eficiente de inibidores. Da mesma forma, métodos que incorporam "beads" magnéticas para capturar e reter ácidos nucleicos podem

produzir materiais com altos níveis de pureza e um bom índice de recuperação. No entanto, mesmo assim algumas destas amostras podem conter substâncias, com propriedades de inibir o processo de amplificação. Numerosos estudos têm demonstrado que pequena, mas significativa proporção de amostras clínicas contém substâncias inibitórias para as técnicas de amplificação (MORSHED *et al.*, 2007). Estas substâncias podem ser provenientes da própria amostra, tais como hemoglobina, lactoferrina, sais biliares, uréia, heparina, certos hormônios, ou podem ser reagentes usados durante a extração dos ácidos nucleicos (NOLAN *et al.*, 2006).

Pode-se relacionar ainda, como fator de geração de resultados negativos, o funcionamento inadequado de equipamentos, uma vez que a performance ótima dos testes moleculares é vinculada a limites estreitos de temperatura e volumes de reagentes. Equipamentos com problemas podem introduzir erros que levam um teste a falhar. Por isso a performance e exatidão de todos os equipamentos e pipetadores devem ser rotineiramente checados, para assegurar que estejam funcionando de acordo com suas especificações. Além disto, a estocagem inadequada de reagentes, especialmente reagentes submetidos a ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, que podem reduzir a atividade enzimática, e erros humanos operacionais podem contribuir na geração de resultados falso-negativos.

Portanto, múltiplos fatores afetam a “performance” de uma reação de amplificação e uma das formas de controlar todas essas variáveis é a utilização de controles internos, capazes de monitorar o processo como um todo. Tais controles garantem uma interpretação conclusiva dos resultados obtidos e têm por objetivo evitar resultados falso-negativos.

O controle interno da qualidade em biologia molecular consiste na análise de amostras controle, com valores conhecidos, que são adicionadas às amostras clínicas ainda na fase de extração.

Através desse controle pode-se avaliar o funcionamento confiável e eficiente dos procedimentos laboratoriais garantindo resultados confiáveis que possam contribuir eficazmente no estabelecimento do diagnóstico pelo clínico. O controle interno da qualidade têm a finalidade de garantir a reprodutibilidade (precisão), verificar a calibração dos sistemas analíticos e indicar o momento de se promover ações corretivas quando surgir uma não conformidade.

Esses controles internos são representados por uma sequência de DNA ou RNA diferente ou similar à sequência de ácido nucleico que está sendo pesquisada

e que é amplificada simultaneamente a este. Em uma reação de PCR com um controle interno, uma banda ou sinal, indicando amplificação deste controle, deve ser sempre produzida independente da ausência ou presença de sinal para a sequência do microorganismo que está sendo pesquisado, assegurando desta forma que um resultado negativo para o microorganismo alvo seja verdadeiramente negativo e não seja devido a falhas na reação de amplificação. Desta forma, uma resposta negativa para o controle interno pode indicar erros humanos operacionais, preparação imprópria da amostra, presença de substâncias inibitórias, problemas técnicos decorrentes de reagentes e equipamentos, que devem ser então investigados. Portanto, estes controles são essenciais para garantir a qualidade e confiabilidade dos resultados gerados pela metodologia de biologia molecular. A concentração de controle interno a ser colocada em uma reação deve ser próxima do mais baixo limite de detecção, de modo que ela possa monitorar mesmo inibições fracas, que podem causar problemas no momento da detecção do ácido nucleico alvo.

Diversos controles internos têm sido desenvolvidos e estão descritos em artigos científicos. Estes controles podem ser endógenos ou exógenos e podem atuar nas reações de PCR por mecanismos competitivos ou não competitivos (HOORFAR *et al.*, 2004).

Controles endógenos ocorrem naturalmente dentro da amostra que está sendo analisada. Por outro lado os controles exógenos, não existem na amostra clínica e são adicionados à mesma antes do isolamento do ácido nucleico ou da amplificação.

1.2.1 Controles Internos não Competitivos

Controles não competitivos são amplificados usando iniciadores diferentes dos utilizados na amplificação do alvo. Na reação de PCR, devem estar presentes iniciadores desenhados para o controle interno e iniciadores para a sequência que esta sendo pesquisada. Isto produz uma PCR em que duas reações com cinéticas diferentes são produzidas simultaneamente. A cinética de cada reação não é influenciada pela competição pelos iniciadores.

Controles internos não competitivos endógenos são genes que são expressos naturalmente dentro da espécie que está sendo analisada. Estes controles são frequentemente utilizados na quantificação relativa por PCR em tempo real, que é uma técnica comumente usada em pesquisas para estudar a expressão de genes RNA (WONG *et al.*, 2005).

Na quantificação relativa a expressão de um determinado gene é determinada em relação a um gene de referência expresso estavelmente (gene housekeeping). Os dois níveis de genes são expressos como índices. Um gene de referência deve ter expressão homogênea entre as amostras em estudo e deve atender certos critérios, antes de ser efetivamente considerado como tal (JONGE *et al.*, 2007). Os Genes "housekeeping" como o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (G3PDH), phosphoribosyltransferase (HRPT), albumina, actinas, tubulinas, ciclofilina, hipoxantina, albumina phosphoribosyltransferase (HRPT), RNA(s) ribossômicos 28S e 18S têm sido usados como referência na quantificação de transcritos (THELLIN, *et al.*, 1999). A utilização destes genes "housekeeping" têm sido questionada, pois segundo estudos, existe uma considerável variação na expressão destes genes em amostras biológicas (WATSON *et al.*, 2007). Dessa forma não há como padronizar o resultado esperado para este tipo de controle. Controles internos não competitivos exógenos não existem na amostra clínica e são adicionados à mesma antes do isolamento do ácido nucleico ou da amplificação. Plasmídeos e vírus não humanos têm sido usados com este propósito.

Um controle interno baseado na utilização de plasmídeos foi feito construindo o plasmídeo pTW107, que resultou da inserção do genoma do vírus da hepatite delta no vetor pGem3z (Promega), flanqueado pelos promotores T7 e SP6. Este plasmídeo foi usado para controlar RT-PCR(s), desenvolvida para nove vírus respiratórios diferentes (DINGLE *et al.* 2004). Um outro plasmídeo foi construído para ser usado como controle interno não competitivo, em um teste de PCR em tempo real, para o (HHV6) vírus herpes humano tipo 6 (HYMAS *et al.* 2005).

Os benefícios da utilização dos plasmídeos é o tamanho, a possibilidade do controle do número de cópias e uma maior estabilidade. O plasmídeo pode ser seguramente estocado em quantidades convenientes por longos períodos com mínima degradação e a sequência alvo pode ser obtida de fonte comercial. Outra vantagem do controle interno de DNA clonado é a estocagem do plasmídeo contendo o DNA recombinante dentro da célula bacteriana o que garante a contínua

disponibilidade e qualidade do controle interno. Porém a grande desvantagem da utilização dos plasmídeos é que eles não controlam o processo por inteiro, porque a lise dos patógenos durante o processo de extração de ácidos nucleicos não é monitorada. Controles internos derivados de plasmídeos consistem de um DNA não protegido e que, portanto pode ser degradado dentro da amostra clínica antes da extração do ácido nucleico ou durante a estocagem da solução de trabalho, o que pode levar a uma não amplificação do DNA, necessitando repetir-se o teste.

O Vírus da Diarréia Viral Bovina serviu como controle interno em uma técnica de RT-PCR, desenhada para triar o vírus da hepatite C em "pools" de amostras em bancos de sangue (CLELAND *et al.*, 1999). Da mesma forma utilizou-se o vírus da diarréia bovina não citopático inativado como controle interno de um sistema TaqMan para quantificação do RNA do HCV (CASTELAIN *et al.*, 2004). Para o preparo, o vírus foi propagado em células MDBK, isolado dos sobrenadantes da cultura, e inativado a 56°C, durante 2 horas. Posteriormente, foi confirmado como não infeccioso por inoculação nas mesmas células em que foi propagado.

O citomegalovírus murino (Coleção de Células Americanas Nº VR-1399), foi o controle interno de uma metodologia de PCR em tempo real para quantificação do vírus da hepatite B (GARSON *et al.*, 2005). Para preparar este controle, o vírus foi cultivado em uma linha de células fibroblastos murinas. Sobrenadantes da cultura foram coletados, clarificados e estocados a - 70°C e foram adicionados na reação. O vírus porcino "phocine distemper vírus" foi o controle não competitivo usado para controlar uma PCR em tempo real para o vírus da hepatite C (CLANCY *et al.*, 2008).

A vantagem destes modelos animais é a estabilidade do RNA e o controle da decapsulação do RNA viral durante o procedimento de extração. Porém, o uso de tais vírus pode gerar questões relativas à segurança e pode haver uma falta de consistência entre as preparações, uma vez que o cultivo celular de vírus requer muitos cuidados técnicos e condições laboratoriais padronizadas.

Uma alternativa aos vírus animais são os bacteriófagos, que apresentam a vantagem de ter características estruturais semelhantes aos vírus patogênicos pesquisados nas técnicas diagnósticas (WALKERPEACH, *et al.*, 2004).

O enterobacteriófago T4, que é um vírus DNA foi estudado para ser usado como controle de extração e amplificação em amostras como fluido cerebrospinal, soro e amostras de fezes. Este bacteriófago é uma alternativa atrativa porque é não patogênico, quantificável, têm um capsídeo estruturalmente complexo, composto por

mais de 1500 subunidades que codificam para aproximadamente 50 genes diferentes. O capsídeo efetivamente protege o DNA encapsulado de nucleases presentes nos fluídos biológicos. O bacteriófago T4 (Attostar LLC, Medina, MN), foi obtido de fonte comercial, e seu uso foi otimizado em amostras clínicas positivas para 13 diferentes patógenos (GERRIETS *et al.*, 2007).

Outro bacteriófago que têm sido estudado e que parece representar uma alternativa interessante para ser utilizado como controle interno é o MS2. O MS2 é um candidato ideal para controlar metodologias que pesquisam vírus RNA. Como estes o MS2 consiste de uma molécula de RNA envolta por um capsídeo. Por isso a sua presença no final da reação garante o controle da decapsulação do RNA viral, durante o procedimento de extração e também a fase de transcrição reversa, indicando que um resultado negativo para o HCV. O seu RNA, é suscetível a degradação e inibição por RNases. Portanto o MS2 é um controle interno com capacidade de monitorar desde o processo de extração até a amplificação e pode ser usado como controle universal em testes para vírus RNA.

O MS2 (DSM13767) proveniente de fonte comercial (DSMZ Braunschweig-Alemanha) foi otimizado como controle interno em uma RT-PCR para o vírus da hepatite C. O bacteriófago foi cultivado em *E. coli XL10 Gold* (Stratagene, La Jolla), pela técnica de ágar em dupla camada. Os "plaques", gerados na superfície do ágar foram coletados, e as partículas do vírus foram recuperadas e usadas como controle interno (DREIER *et al.*, 2005).

O MS2 (15597-B1™), obtido da "American Type Culture Collection - ATCC" foi usado como controle interno em técnica para detecção do norovirus (ROLF *et al.*, 2007).

A vantagem da utilização de controles baseados em bacteriófagos é que eles podem ser utilizados para controlar diversos testes, sendo necessária somente a padronização. Além disto, podem ser facilmente propagados, não são infecciosos para os humanos, podem ter sua concentração determinada e são seguros durante a sua produção e transporte. A desvantagem é que ao encontrar um hospedeiro adequado podem proliferar e causar sérios problemas de contaminação. Além disto, a RNA replicase do MS2 é uma polimerase de baixa fidelidade e pode produzir mutações e deleções no RNA padrão (PALOSKE *et al.*, 1998).

1.2.2 Controles Internos Competitivos

Ao contrário dos controles internos não competitivos, os controles internos competitivos geralmente são exógenos e usam fragmentos de DNA que são co-amplificados pelos mesmos iniciadores que o microorganismo alvo, sob as mesmas condições e no mesmo tubo de PCR. No entanto, estes controles possuem características como tamanho do fragmento ou variações na sequência que permitem que estes sejam distinguidos da sequência objeto de pesquisa. Nesta estratégia, existe sempre competição entre o alvo e o controle interno, por isso a quantidade de controle interno a ser adicionada à amostra é crítica pois pode ter influência no limite de detecção da técnica. Ocorre simultaneamente amplificação de dois diferentes fragmentos de DNA flanqueados pelos mesmos iniciadores, o que pode resultar em inibição ou aumento de um ou de ambos os produtos, dependendo da relação molar, do tamanho da sequência e de estruturas secundárias dos fragmentos de DNA. Controles internos competitivos têm apresentado ser efetivos para distinguir resultados de PCR negativos verdadeiros e falsos, e quando usados em quantidades conhecidas podem ser utilizados para quantificar alvos clínicos.

A construção de plasmídeos também é um método de se obter controles internos competitivos. Um controle baseado em plasmídeo foi desenvolvido criando-se um painel de quatro controles internos diferentes e utilizando o plasmídeo pGLE-neo, que contém o gene neomicina transferase, como fonte de DNA heterólogo Stöcher *et al.*(2002). Dentro do gene neo um segmento com 151 pares de bases foi selecionado para desenhar sondas de hibridização neo-específicas. Pares de "primers" específicos para citomegalovírus (CMV), Varicella zoster vírus (VZV) e para o vírus da Hepatite B - HBV (duas versões) foram obtidos. Estas sequências foram inseridas nas regiões 5' e 3' da região do gene neo escolhida. Desta forma, foram gerados quatro controles internos específicos. Os produtos foram clonados no plasmídeo pT-Adv. Os plasmídeos foram purificados depois de transformados em bactérias e linearizados, sendo então usados como controles internos em reações específicas para as quais os mesmos foram desenhados.

O mesmo autor criou um controle único para estes vírus usando como fonte de DNA heterólogo o mesmo plasmídeo pGLE-neo e o mesmo segmento com 151 pares de bases para desenhar sondas de hibridização neo-específicas. Na

montagem deste controle foram gerados múltiplos controles internos de DNA utilizando a técnica "overlapping extension" que se baseia na utilização de "primers" com sequências que se sobrepõem (STÖCHER *et al.* 2003). Cinco PCR(s) consecutivas foram feitas, usando cinco grupos de "primers" que continham sequências específicas para os vírus Epstein-Barr (EBV), Citomegalovirus (CMV), Varicella zoster virus (VZV), Herpes simplex virus (HSV) e vírus da hepatite B (HBV). Na primeira PCR foi usado "primer" forward com sequências HBV-NEO e reverso com sequências NEO-HBV, na segunda o forward HSV-HBV e o reverso HBV-EBV, na terceira utilizou-se o forward VZV-HSV e o reverso EBV-CMV, na quarta o forward CMV-VZV e o reverso CMV-VZV e na quinta o forward EBV-CMV e o reverso VZV-HSV. Desta forma as respectivas sequências de "primers" foram adicionadas nos finais da região 5' e 3' da sequência escolhida do gene neo (neomicina fosfotransferase) produzindo um controle único, contendo as sequências dos "primers forward" e reversos dos cinco vírus. A Figura 3 é uma representação esquemática desse controle interno desenvolvido.

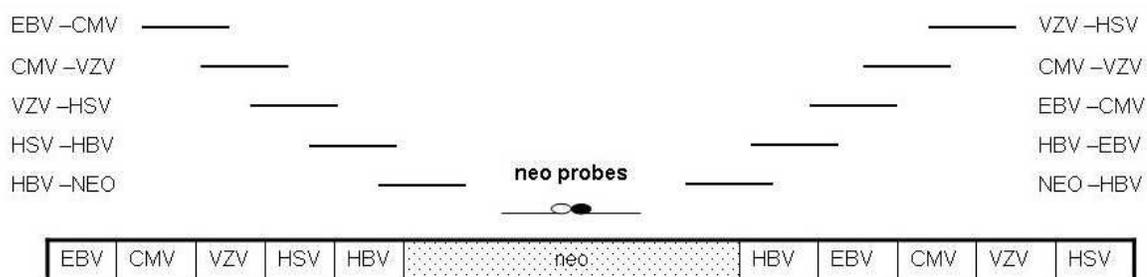


FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CONSTRUÇÃO DE UM CONTROLE INTERNO PARA MÚLTIPLOS PATÓGENOS

FONTE: STÖCHER *et al.* (2003, p. 3)

Nota: "Primers forward" e reversos para EBV, CMV, VZV, HSV e HBV, desenhados para PCR em tempo real foram adicionados sequencialmente às regiões 5' e 3' de um DNA heterólogo (gene neo)

Após a montagem, a sequência foi clonada no plasmídeo PCR II-Topo. O DNA do plasmídeo resultante foi obtido após transformação em bactéria. O plasmídeo contendo o controle interno foi linearizado e foi utilizado na PCR em tempo real para os diferentes vírus, utilizando "primers" e sondas específicas. O

mesmo modelo de montagem de controle interno foi adotado para criar também um controle único para detectar e quantificar o vírus da Hepatite B, polyomavirus humano, o vírus Epstein-Barr, *Toxoplasma gondii* e cytomegalovírus (MAAROUFI *et. al.*, 2006).

Burggraf e sua equipe (2005), utilizaram como controle interno nos testes de PCR em tempo real oligonucleotídeos de fitas únicas consistindo basicamente das regiões de ligação dos "primers" e das sondas do DNA alvo. Mismatches foram introduzidos dentro dos sítios de ligação para a sonda com o objetivo de permitir a detecção (BURGGRAF *et. al.*, 2005).

A técnica baseada na amplificação da sequência de ácidos nucleicos (NASBA), que é um processo isotérmico no qual participam três enzimas, a transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, uma RNase H e a RNA polimerase do fago T7 e dois oligonucleotídeos utiliza um controle interno que é um RNA e que foi construído em duas fases: na primeira fase uma molécula de dupla fita de DNA contendo as sequências não alvo foi ligada a sequências alvo complementares aos "primers" NASBA. O final 5' desta molécula de DNA é a sequência de ligação da enzima T7 RNA polimerase. Na segunda fase da construção, transcritos de RNA foram produzidos pela T7 RNA polimerase. Este RNA é o controle interno, que é amplificado pelos "primers" NASBA que também amplificam o alvo e é detectado por uma sonda molecular beacon complementar as sequências não alvo internas. A utilização deste controle foi devidamente otimizada.

Bacteriófagos DNA também têm sido usados como controles internos competitivos em testes clínicos virais (WALKERPEACH *et al.*, 2004). O controle interno múltiplo gerado para um painel de vírus (STÖCHER *et al.*, 2003), citado acima foi empacotado no fago lambda usando um procedimento tradicional de clonagem. Este procedimento gerou partículas de fagos contendo controle interno de DNA (STÖCHER *et al.*, 2004). As partículas de fago lambda contendo o controle interno são resistentes a digestão por DNase I e exibem propriedades de manuseio, estocagem e amplificação melhoradas.

O bacteriófago Q β , um fago RNA serviu de base para o desenvolvimento de um controle interno competitivo que foi utilizado em uma reação de RT-PCR para o vírus da hepatite C (VILLANOVA *et.al.* 2007). Outro controle interno criado por cientistas da Ambion, derivado de bacteriófago foi o armored RNA (US Patents 5677124, 5919625 e 5939 262), que se baseia na estratégia usada pelos

bacteriófagos para proteger seu RNA genômico (PASLOSKE *et al.* 1998), A tecnologia para produzir o RNA armored está representada na Figura 4.

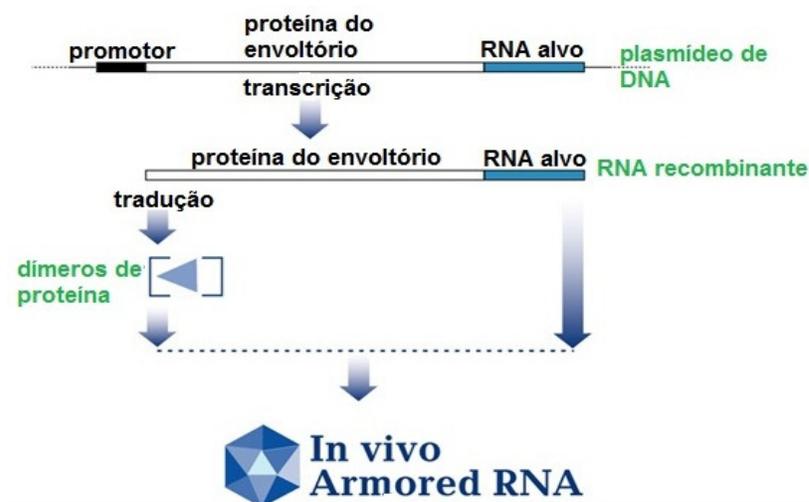


FIGURA 4 - SISTEMA DE EMPACOTAMENTO DO RNA ARMORED

Esta tecnologia é um sistema de empacotamento dirigido por plasmídeos, no qual DNA codificando a proteína do envoltório do bacteriófago do MS2 e a sequência de RNA de interesse foram clonadas sob controle de um promotor induzível. O plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli*. Após indução, o RNA codificando a proteína do envoltório e a sequência de interesse foram transcritas a partir do plasmídeo recombinante e a proteína do envoltório foi traduzida a partir do RNA. Uma concentração crítica da proteína do envoltório liga-se especificamente ao RNA, levando a montagem de partículas pseudovirais. O RNA empacotado é resistente a digestão por ribonucleases e é estável durante longos períodos de tempo. Quando este RNA empacotado é extraído da proteína do envoltório, ele é completamente compatível com a transcrição reversa. O primeiro controle interno desenvolvido usando esta metodologia foi feito para HIV (PASLOSKE *et al.*, 1998). No ano seguinte, foi desenvolvido o controle armored para o vírus da hepatite C, genótipo 2 (WALKERPEACH *et al.*, 1999). Esse controle foi testado em técnicas desenvolvidas para quantificação do vírus da hepatite C, RT-PCR, b-DNA e também em testes de genotipagem. Estas partículas virais sintéticas demonstraram ser muito valiosas nos testes diagnósticos moleculares para o vírus

da hepatite C (CARTWRIGHT *et al.*,1999), por isso foram criadas também para outros genótipos e para outros vírus.

Preparou-se partículas armored para serem usadas em uma reação de RT-PCR em tempo real para a detecção do Coronavírus, agente patogênico da Síndrome Respiratória Aguda (CHENG *et al.* 2006). Um segundo foi construído e utilizado como controle positivo e padrão em uma RT-PCR quantitativa para o vírus da rubéola (ZHAO *et al.* 2007) e um terceiro foi preparado utilizando sequências de três vírus, influenza A, influenza B e SARS-CoV (XIN *et al.* 2008). Uma metodologia para empacotamento de sequências de RNA longas, com mais de 2000 bases foi descrita por (WEI *et al.* 2008).

A principal vantagem destes controles é que o RNA empacotado é estável e resistente a ribonucleases no plasma e estes controles podem ser usados para controlar a fase de extração das amostras, porque podem ser adicionados diretamente a amostras de pacientes sem o risco de serem degradadas por nucleases presentes na própria amostra. Desta forma se o RNA alvo é degradado ou se inibidores enzimáticos são copurificados com o ácido nucleico que está sendo pesquisado, um resultado mais baixo será obtido para o controle RNA.

O RNA armored é efetivo como controle da extração, amplificação e detecção de um teste específico, porém é caro e é um produto comercial. Além disto, partículas pseudovirais são difíceis de ser sintetizadas e representam a menor parte do genoma do bacteriófago. Para alvos com regiões altamente conservadas a construção do RNA armored é significativa; para vírus com subtipos divergentes pode ser problemático.

Portanto, diversas estratégias de desenvolvimento de controles internos estão disponíveis em artigos científicos. No entanto, o que é essencial na criação de um controle interno é que este seja fácil de ser produzido e padronizado. Além disto, deve ser estável, não infeccioso e deve estar ausente em amostras clínicas.

1.3 BACTERIÓFAGOS

Bacteriófagos são vírus de ocorrência natural que infectam parasiticamente bactérias. Estes organismos foram descobertos em 1915 por Frederick Twort e Felix d'Herelle em 1917 e têm sido estudados desde então. Em 1920 e 1930 foi

observado que diferentes tipos de fagos apresentavam especificidade para diferentes bactérias. A especificidade destes fagos é determinada por sítios receptores, moléculas de proteínas, localizadas na superfície celular, em diferentes partes da bactéria. Com o advento da microscopia eletrônica, foi possível determinar o tamanho físico dos fagos, o comprimento das fibras da cauda e a simetria do capsídeo, dando origem a uma taxonomia baseada nos morfotipos (1940 - 1950).

Em 1952, a descoberta de Hershey e Chase de que apenas o DNA do fago penetrava na bactéria durante a infecção, e que, portanto induzia a produção de novas partículas de fago, sugeriu imediatamente que os fagos poderiam ser utilizados como veículos de clonagem. Desde então estes passaram a ser intensivamente explorados como vetores para manipulação genética.

Durante os anos 60, avanços nos métodos bioquímicos para isolar ácidos nucleicos de fagos permitiram a determinação do tamanho e do tipo de genoma destes vírus, que hoje têm sido usados com os mais diversos propósitos.

1.3.1 Estrutura e Morfologia dos Bacteriófagos

Os fagos basicamente consistem de uma molécula de ácido nucleico (genoma), envolta por um capsídeo constituído por proteínas codificadas pelo genoma do fago. A função do capsídeo é proteger o genoma viral de danificação por fatores ambientais e assegurar eficiente liberação do genoma nas células alvo. Capsídeos também contêm estruturas com outras funções como reconhecimento e ligação com a célula hospedeira, injeção do genoma na célula hospedeira, e lise dessa célula. Os capsídeos podem ter formas e tamanhos diferentes. Alguns fagos contêm também uma bicamada lipídica e estruturas tais como caudas. Os genomas virais também são variáveis. Eles podem ser de DNA ou RNA, de fita simples (ss) ou de fita dupla (ds) e são resistentes à digestão por DNases e ribonucleases respectivamente, devido à presença da proteína do envoltório.

O ciclo de vida dos bacteriófagos compreende uma fase intracelular e uma fase extracelular. Na fase extracelular, os fagos existem como partículas ou vírions. Um vírion consiste de uma molécula de ácido nucleico, DNA ou RNA, contido dentro da proteína do envoltório ou capsídeo. A fase intracelular inicia-se somente quando o vírus injeta seu material genético na célula hospedeira. Dependendo do vírus envolvido ele entrará em um ciclo de vida lítico ou lisogênico. No ciclo lisogênico o

ácido nucleico do vírus torna-se parte do material genético da bactéria ou formará um DNA circular, chamado plasmídeo, dentro do citoplasma da célula hospedeira. Neste caso, o ácido nucleico viral replica-se e divide-se ao mesmo tempo que a célula hospedeira. No ciclo lítico o ácido nucleico viral assume a direção do metabolismo celular para replicar o seu próprio ácido nucleico.

1.3.2 Bacteriófago MS2

O MS2 pertence à família Leviviridae e têm um genoma linear, de RNA de fita simples (ssRNA), com polaridade positiva, envolto em um capsídeo com estrutura icosaédrica de 275 Å, sem cauda e sem nenhum apêndice de superfície (STOCKLEY *et al.*,1994). O MS2 têm orifícios nos eixos de dobradura 5 e 3, que podem ser pontos de saída do RNA, durante a infecção bacteriana (KUZMANOVIC *et al.*2005). A Figura 5 é uma imagem do MS2 obtida por microscopia eletrônica.

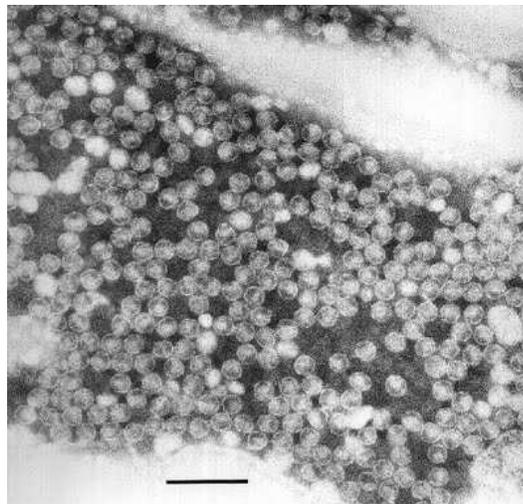


FIGURA 5 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA PARA O MS2

FONTE: LARS LILJAS, Uppsala University

O genoma do MS2 foi completamente sequenciado por Fiers *et al.* (1976), e têm 3.569 nucleotídeos que codificam quatro proteínas necessárias para a multiplicação e espalhamento do fago. Esta sequência determina também uma

estrutura de RNA específica, otimizada para o controle da tradução, replicação e outras funções virais. Portanto estas estruturas contribuem substancialmente com o sucesso da reprodução do organismo (MEERTEN *et al.*, 1999).

As proteínas codificadas por esta sequência são: maturação ou proteína A, a proteína do envoltório do bacteriófago, a proteína de lise e a replicase, que contribuem na maturação, encapsidação, lise do hospedeiro e replicação do RNA do fago, respectivamente. Todos os genes são separados por segmentos intergênicos, exceto o gene da proteína de lise, que parcialmente se sobrepõe aos genes da proteína do envoltório e da RNA replicase. A Figura 6 é uma representação deste genoma.

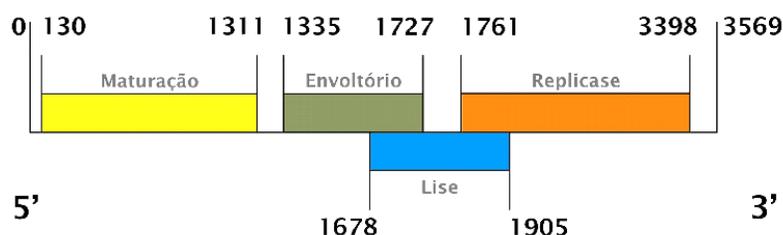


FIGURA 6 - ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DO MS2

FONTE: Lars Liljas, Uppsala University

A proteína do envoltório têm um peso molecular relativo $M_r = 13.700$, e é o componente estrutural principal do capsídeo do vírion (ELASHVILI *et al.* 2005). Através de análise cristalográfica verificou-se que o vírion é composto por 90 homodímeros da proteína do envoltório, o que representa cento e oitenta unidades monoméricas desta proteína que juntamente com uma cópia da proteína A, formam o envoltório do vírus MS2 com 275 Å (TOROPAVA *et al.*, 2007; KUZMANOVIC *et al.* 2003 e KUZMANOVIC *et al.* 2005).

Esta proteína do envoltório está envolvida na regulação da expressão dos genes do MS2 e também têm funções no empacotamento. Liga-se a uma estrutura em forma de alça no RNA viral para fazer a encapsidação do genoma e a repressão da tradução da síntese da replicase.

A proteína A ou de maturação com peso molecular relativo $M_r = 44.000$, é o componente menor da partícula do vírus, e que está envolvida na ligação do fago ao pilus bacteriano, replicação, empacotamento do RNA e infectividade "in vitro". Não se sabe ao certo a exata localização desta proteína no vírus, porém experimentos com marcação química e anticorpos indicam que ela está no mínimo parcialmente exposta na superfície do capsídeo, o que suporta a idéia de que esta proteína corresponde a um dos vértices da forma icosaédrica do MS2 (KUZMANOVIC *et al.*, 2003).

As proteínas replicase e lise estão envolvidas na replicação e lise da bactéria *E. coli*, respectivamente.

A proteína L, de lise, é produzida pelo MS2 em quantidades muito pequenas e foi identificada como um polipeptídeo que se liga à membrana. Contém 75 aminoácidos e é um potente ativador da lise das células. O seu efeito lítico só pode ser observado em células crescendo e ela não depende da expressão de outras proteínas pelo fago para a sua atividade (BERKHOUT *et al.* 1985). Existem indicações de que esta proteína age interferindo no controle das enzimas autolíticas do hospedeiro.

A criação das proteínas do fago é explicitamente controlada pelo genoma, no que diz respeito à quantidade e ao momento do aparecimento. Interações regulatórias entre os genes do fago são bem caracterizadas. A proteína do envoltório reprime a expressão do gene da replicase, e a expressão dos genes do envoltório e de lise estão positivamente correlacionadas com a leitura do processo de tradução. Em contraste, a expressão da proteína de maturação é independente da expressão dos outros genes do MS2 e não interfere na expressão dos mesmos (POOT *et al.* 1997).

O RNA genômico do MS2 dobra-se em uma estrutura secundária complexa que está envolvida na regulação gênica por meio de interações RNA proteína (BERNGRUBER *et al.*). Os elementos chave neste processo de regulação são: o "loop" do operador central do MS2, situado na posição 1715-1765, sequência esta localizada na região de sobreposição dos genes replicase e de lise, formas de "hairpin", presentes nas terminações da proteína do envoltório que contém a sequência Shine-Dalgarno, e o códon de início do gene replicase.

Expressão da replicase é controlada por dois mecanismos: por uma interação a longa distância entre um segmento interno no início do gene do

envoltório que possui sítios de ligação específicos para uma região localizada no início do gene replicase chamada de operador transcricional. Esta interação impede a síntese do gene replicase na ausência de tradução do gene do envoltório. Postula-se também que esta ligação, seja um sinal de empacotamento, determinando o início da montagem do capsídeo assegurando o reconhecimento e a encapsidação seletiva do fago RNA.

Deslocamento dos ribossomos, através do gene do envoltório quebra este mecanismo de repressão e ativa o início da transcrição do gene replicase. Estudos de expressão identificaram um pareamento de bases entre 1427 - 1433 e 1738 - 1744, que foi chamado interação Min Jou (MJ), como sendo a base molecular para este mecanismo de acoplamento a longa distância (LICIS *et al.*, 1998).

O outro controle da expressão do gene replicase é feito pela ligação da proteína do envoltório ao RNA que é ao mesmo tempo o ponto de nucleação para o processo de empacotamento viral (PEABODY *et al.*, 1997). A proteína replicase, é necessária em pequenas quantidades, e é sintetizada nos primeiros 20 minutos de infecção, depois do que a sua síntese é inibida pela proteína do envoltório.

O gene de maturação é precedido por uma sequência líder com 130 nucleotídeos que foi apresentada dobrar-se na região 5' terminal em um "hairpin" seguido por três alças unidas por uma interação a longa distância (LID), formando um trevo (POOT *et al.* 1997). A interação ocorre entre esta estrutura e a sequência de Shine-Dalgarno do gene de maturação e impede a tradução desta proteína. Entretanto têm sido demonstrado que a formação da estrutura em trevo é cineticamente demorada, existindo desta forma um tempo para os ribossomos acessar o RNA. Perturbação desta estrutura por inserções tornam os sítios de início da maturação permanentemente acessíveis.

A proteína de maturação é necessária em pequenas quantidades, uma única cópia por vírion. Desta forma a transcrição é mantida em um baixo nível.

A síntese da proteína L também é controlada a nível de tradução (YOUNG *et al.*, 1992). O gene de lise somente é expresso quando ocorre a tradução do gene do envoltório, das sequências compartilhadas pelos dois genes (envoltório e lise). As bases moleculares deste controle estão ligadas a presença de um hairpin entre os nucleotídeos 1.636 e 1.707 (BERNGRUBER *et al.*). Neste "hairpin" os resíduos G na região de Shine Dalgarno e o códon de início são inacessíveis a RNase T1, o que é

consistente com o fato de que o acesso ao ribossoma é bloqueado, quando não existe tradução do gene do envoltório. O contrário ocorre no momento da tradução.

1.3.2.1 Processo de Infecção do Bacteriófago MS2

Fagos contendo RNA, como o MS2, infectam a célula através de receptores localizados na fímbria de fertilidade (F) da bactéria hospedeira (pili). A produção do pili é geralmente codificada por um plasmídeo, chamado F, e só ocorre em temperaturas acima de 30°C. Bactérias que contêm este plasmídeo são chamadas de F positivas (F+), e as que não contêm são chamadas de F menos (F-). O pili, codificado pelo plasmídeo F é uma proteína tubo que normalmente faz a ligação de uma célula bacteriana F+ e outra F-, no momento da conjugação, servindo de conduto para a transferência de material genético entre as células neste processo.

O fago MS2 infecta as células através da adsorção ao pili e penetração do RNA através desse pili. Aderência do fago a proteína de superfície do pili ocorre com a participação da proteína A de maturação do MS2. A proteína do envoltório não têm nenhum envolvimento neste processo.

Uma vez no interior da bactéria, inicia-se uma resposta lítica na qual, o fago redireciona o metabolismo da bactéria e utiliza recursos energéticos e materiais (ribossomos, fatores para a síntese de proteínas, aminoácidos) das mesmas, procedendo imediatamente com a replicação. Uma pequena quantidade de ácido nucleico do fago consegue ser responsável pela subversão completa de toda a capacidade sintética da célula para a produção de novos fagos é este é um dos aspectos mais fascinantes e menos compreendido da replicação fágica. Novos vírus são liberados em grandes quantidades pela lise da célula bacteriana infectada. Em meios de cultura sólidos contendo as bactérias hospedeiras, estes fagos produzem tipicamente placas claras, chamadas de "plaques".

Os processos bioquímicos que ocorrem em células infectadas são controlados e têm uma progressão ordenada. Na fase chamada pré-inicial, o fago apodera-se da maquinaria de síntese proteica e prepara a célula para a produção de

macromoléculas. Outros mecanismos ainda não esclarecidos asseguram que apenas o ácido nucleico do fago seja replicado.

Na fase inicial ocorre a síntese de enzimas e substratos necessários para a posterior replicação do ácido nucleico. Na fase final ou tardia são sintetizadas: a enzima replicase, envolvida na replicação do RNA viral, as unidades estruturais da proteína do envoltório e a proteína de maturação. Segue-se então a montagem da proteína envoltório, e o empacotamento seletivo do genoma de ácidos nucleicos e a lise celular com liberação das partículas virais para o meio extracelular. Este processo está representado na Figura 7.

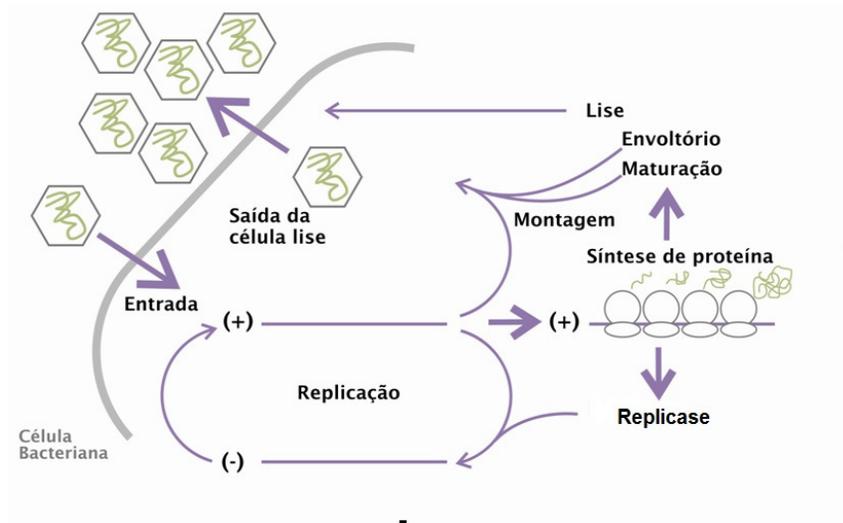


FIGURA 7 - CICLO DE VIDA DO BACTERÍÓFAGO MS2

FONTE: ANDERSON *et al*, 2006

1.3.2.2 Utilização do Bacteriófago MS2

Na metade do século 20, os bacteriófagos representavam um dos mais importantes modelos em biologia molecular, sendo muito utilizados em estudos de adsorção, penetração, replicação, tradução de genomas virais, montagem e liberação de partículas. No final do século estes vírus tornaram-se menos atrativos

devido ao desenvolvimento de sistemas mais sofisticados para estudar células eucarióticas. No entanto, nos últimos anos, iniciou-se uma nova era na biologia dos bacteriófagos. Isto porque demonstrou-se que estes vírus que infectam bactérias podem ser muito importantes não somente em estudos biológicos básicos, mas também na medicina e na biotecnologia.

O MS2, por ser um vírus de tamanho pequeno, ter uma estrutura simples e genoma de RNA, ser inócuo para humanos, animais, plantas e outros organismos, têm sido muito usado como simulador, no lugar de pequenos vírus RNA, tais como Ebola virus, Marburg virus e Alphavirus de encefalite equina, (O'CONNELL *et al.*, 2006). Virus simulantes usados em estudos de defesa biológica devem aproximar-se dos patógenos humanos no que diz respeito ao tamanho do seu genoma, composição de ácido nucleico e tamanho do vírion. Além disso, devem ser não patogênicos, fáceis e baratos de se cultivar e de se detectar usando métodos laboratoriais comuns. O bacteriófago MS2 não preenche todas essas exigências em relação aos pequenos vírus RNA mencionados acima, porém têm sido usado pela comunidade de defesa biológica e têm demonstrado ser tecnicamente razoável.

Todos os fagos F-RNA como o MS2, são teoricamente os melhores modelos para vírus entéricos porque lembram os vírus humanos com relação à sua origem e liberação no ambiente (GRABOW *et al.* 2001). Os colifagos são excretados durante todo o tempo por todos os humanos e por outros animais de sangue quente, enquanto que os vírus entéricos são excretados quase que exclusivamente por humanos durante a infecção que pode durar alguns dias ou algumas semanas. Além disto, os fagos F-RNA, como os vírus humanos, falham em multiplicar-se no ambiente, uma vez que a fímbria de fertilidade só é produzida em temperaturas superiores a 30°C. Soma-se ainda o fato de que, em termos de composição, estrutura e tamanho, os colifagos estão muito próximos dos vírus entéricos humanos.

Devido a estas características os fagos são particularmente úteis para testar o comportamento e a sobrevivência dos vírus entéricos nos ambientes e como substitutos para testar a resistência de vírus humanos nos processos de tratamento e desinfecção de águas, com a vantagem de que os fagos, quando comparados aos vírus entéricos, podem ser detectados por técnicas simples, rápidas e baratas. A presença de fagos em águas ambientais representa um indicador da presença de excreções humanas e de animais, e portanto a possibilidade da presença potencial

de vírus entéricos. O MS2 pode servir também como marcador quantitativo da efetividade de agentes anti-virais e antissépticos, devido a sua facilidade de crescimento, purificação, inocuidade para o homem e durabilidade

Outra aplicação muito importante do MS2 é na biotecnologia. Nesta área muitos estudos têm sido feitos com o objetivo de encapsular RNAs heterólogos em capsídeos de fagos RNA, e grande parte destes estão dirigidos para este bacteriófago. (RUMNIEKS *et. al.*,2008), que têm sido utilizado no desenvolvimento de vacinas sob a forma de VLPs (Virus Like Particle), também chamadas pseudovírions e que lembram partículas virais, uma vez que se compõe de proteínas do capsídeo viral, que são montadas por elas mesmas de uma maneira altamente organizada, formando estruturas não replicativas, geralmente esféricas. VLPs produzem boas vacinas por causa da regularidade com que a estrutura do capsídeo apresenta epítomos virais como densos arranjos repetitivos, que são altamente estimulatórios para as células B. Epítomos estranhos ligados aos VLP(s) por conjugação química ou fusão genética também apresentam alta imunogenicidade (PEABODY, D.S. *et al.*, 2009). VLP(s) são produzidos para expressão heteróloga de certos genes virais estruturais em bactérias, fungos, ou em células eucarióticas superiores.

A produção de VLPs utilizando o MS2 ou outros fagos RNA é possível porque a proteína do envoltório destes vírus possui toda a informação necessária para a montagem da forma icosaédrica. Isto significa que os capsídeos virais podem ser produzidos por expressão do gene do envoltório a partir de um plasmídeo, em *Escherichia coli*, sem a necessidade de outros componentes virais (PEABODY, 2003).

Os dímeros de proteínas do envoltório, que formam a subunidade estrutural a partir das quais os capsídeos são montados, possuem um sítio de ligação de alta afinidade para um "hairpin" específico de RNA. Uma vez que este "hairpin" funciona como um sinal de empacotamento, ele é capaz de encapsidar arbitrariamente RNAs escolhidos, fundindo os mesmos a um chamado "pac site" que pode expresso em *Escherichia coli*.

Desta forma, baseando-se nesta propriedade, os genes da proteína do envoltório de numerosos fagos RNA têm sido reverso transcrito, clonados, e expressos em *Escherichia coli*, permitindo a montagem destes VLPs, sem a necessidade de qualquer outro componente viral. Tais VLPs recombinantes

encapsulam RNA intracelular, que possuem a sequência formadora do "hairpin" e são morfologicamente e imunologicamente indistinguíveis dos fagos nativos (PICKETT *et al.*, 1993).

Estes VLP(s) do MS2 também podem ser utilizados na técnica de phage display, na qual peptídeos de diferentes patógenos são expressos na superfície destes VLP(s) (ANDERSON *et al.*, 2006), conforme mostrado na Figura 8.

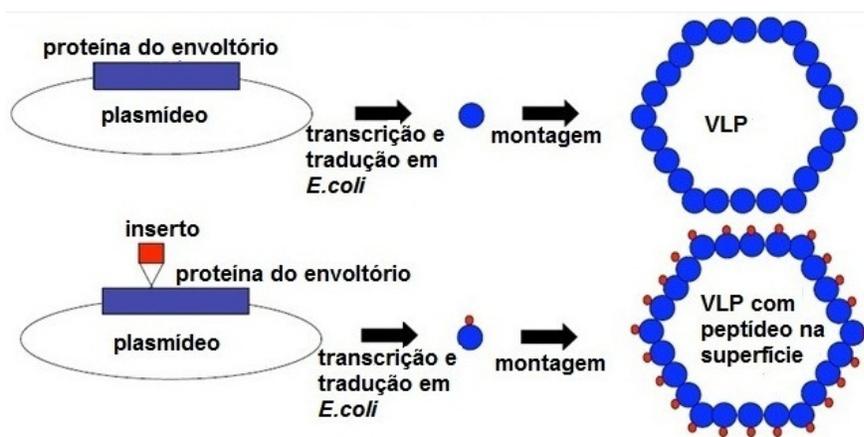


FIGURA 8 - "PHAGE DISPLAY" USANDO VLP(S) DO MS2

FONTE: ANDERSON *et al.* (2006)

Montagens baseadas no MS2 têm sido otimizadas com o objetivo de desenvolver uma vacina para a influenza A (FILETTE, 2005). Em outra aplicação, o RNA mensageiro do hormônio do crescimento foi empacotado dentro das VLPs do MS2, demonstrando o potencial dos capsídeos dos fagos de RNA como carreadores e possíveis veículos liberadores de RNAs mensageiros.

Outros VLP(s), têm sido desenvolvidos utilizando o MS2, baseando-se na propriedade de que os capsídeos de fagos RNA exibem uma marcável estabilidade e desta forma podem servir como "containers" para proteger moléculas de RNA de nucleases, mantendo as mesmas protegidas de ribonuclease.

Estes padrões chamados "armored RNA" têm sido utilizados como controle interno em testes de detecção de RNA por RT-PCR. Controles "armored" específicos para diferentes patógenos têm sido elaborados. Para o HCV estes controles estão disponíveis para diferentes genótipos e podem ser usados como controle interno em testes diagnósticos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL DO PROJETO

O objetivo deste projeto foi o desenvolvimento de controle interno derivado do bacteriófago MS2 para ser usado em uma metodologia diagnóstica para o vírus da hepatite C (HCV) baseada em PCR em tempo real.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PROJETO

- Desenvolver um controle interno não competitivo, CI MS2, contruindo o vetor de clonagem pGEM[®]-T Easy - MS2 e o vetor de expressão pET47b(+) - MS2 e utilizar este vetor para produzir as partículas do MS2;
- Desenvolver um controle interno competitivo, CI MS2 recombinante, usando uma sequência sintética derivada do HCV para modificar o genoma do MS2 no vetor pET47b(+) - MS2 e obter o pET47b(+) - MS2 - sequência sintética e usar este vetor para expressar as partículas do MS2 recombinante;
- Padronizar o uso destes controles internos na reação de RT-PCR em tempo real para o vírus da hepatite C definindo a quantidade ideal de cada um a ser adicionada às amostras clínicas antes da extração do ácido nucleico da amostra;
- Avaliar a influência destas quantidades de controle interno escolhidas na performance da metodologia diagnóstica para definir cargas virais altas e baixas do HCV;
- Estabelecer a melhor forma de acondicionamento do CI MS2 e do controle interno competitivo;

2.3 JUSTIFICATIVA

Atualmente a detecção quantitativa do vírus da hepatite C tornou-se muito importante em diferentes áreas da pesquisa e no diagnóstico clínico. A determinação da carga viral permite o acompanhamento da dinâmica da proliferação do vírus e têm grande valor prognóstico em inúmeras situações clínicas uma vez que serve como base para orientar e monitorar intervenções terapêuticas. O desenvolvimento e utilização destas técnicas na triagem de doadores em Bancos de Sangue com o objetivo de reduzir a janela imunológica representam uma meta a ser atingida pelos Serviços de Hemoterapia.

Até então têm sido utilizados na triagem de doadores testes sorológicos enzimáticos que têm contribuído para reduzir significativamente o risco de transmissão do HCV através de transfusão sanguínea. No entanto o risco zero de transmissão destes agentes não foi obtido com a utilização destes testes, e o risco residual permanece devido a fatores como variantes virais, soroconversão atípica, e principalmente a doações de sangue feitas no período prévio a soroconversão, conhecido como fase de janela imunológica, que compreende desde o momento que o indivíduo se infectou até o aparecimento dos primeiros anticorpos. Na hepatite C o aparecimento dos primeiros anticorpos detectáveis ocorre aproximadamente 70 a 82 dias após a contaminação. Desta forma doações feitas durante este período oferecem o maior risco, uma vez que os doadores serão negativos nos testes sorológicos, sendo as bolsas liberadas para uso, contaminando os receptores.

Primeiramente para reduzir esta fase, testes por biologia molecular foram propostos, uma vez que os ácidos nucleicos virais são os primeiros marcadores detectáveis no soro de indivíduos acometidos. Somente a partir de certo período é que aparecem os antígenos e anticorpos detectados nas técnicas imunoenzimáticas. Recentemente tornaram-se disponíveis os testes comerciais que detectam o antígeno core. Os testes moleculares proporcionam uma redução da janela imunológica na ordem de 83% (70 - 82 dias para 20 dias) para o vírus da hepatite C e têm sido utilizados por diversos países da Europa, Estados Unidos, Austrália e Japão. O antígeno core é detectado em média um a dois dias depois que o RNA é detectado e portanto pode reduzir a janela imunológica em níveis muito próximos aos testes moleculares (LAPERCHE *et. al* 2005).

Na biologia molecular a PCR em tempo real têm sido amplamente utilizada para detecção e quantificação de ácidos nucleicos virais presentes em amostras clínicas. A técnica permite análise rápida e acurada, mesmo quando estes ácidos nucleicos estão presentes em quantidades muito baixas na amostra a ser analisada. Além disto esta metodologia têm sido adaptada a sistemas automatizados para ser utilizada em bancos de sangue.

No Brasil, o desenvolvimento de uma tecnologia NAT (*nucleic acid technology*) nacional se tornou prioridade do Ministério da Saúde, a partir de fevereiro de 2002, quando foi publicada a Portaria nº 262, que tornava obrigatória a inclusão dos testes NAT para HIV e HCV no âmbito da hemorrede nacional, em todas as amostras de sangue. Inúmeras dificuldades foram encontradas, devido ao alto custo dos produtos importados disponíveis no mercado e a falta de estrutura física para realização destes testes. Por isso, em 2004, teve início o Projeto NAT no Instituto de Biologia Molecular, em parceria com o Instituto em Imunobiológicos da Fiocruz (Biomanguinhos) e a Universidade Federal do Rio de Janeiro, com recursos do Ministério da Saúde. Este projeto visava o desenvolvimento de testes por biologia molecular para a detecção simultânea dos vírus HIV e HCV, utilizando uma plataforma metodológica sensível, automatizada e de baixo custo para implementação na Hemorede Nacional. Foi desenvolvido um teste multiplex, utilizando como base tecnológica a reação de PCR em tempo real.

A PCR em tempo real é uma técnica com alto nível de sensibilidade, porém isto não exclui a possibilidade de ocorrência de resultados falso-negativos que podem colocar em risco o tratamento de pacientes e influenciar decisões terapêuticas. Nos serviços de hemoterapia este problema é ainda mais grave uma vez que uma bolsa de sangue é fracionada em pelo menos 6 componentes e os pacientes transfundidos com estes hemoderivados podem ser contaminados.

Estes resultados falso-negativos podem ser causados por: amostras degradadas, presença de inibidores na reação de amplificação, problemas com reagentes, problemas com equipamentos e erros humanos operacionais. A única forma de identificar estes resultados é a utilização de controles internos efetivos que possam distinguir resultados negativos falsos de resultados negativos verdadeiros, uma vez que os problemas acima citados também comprometeriam a detecção do controle.

Desta forma, a construção de controles internos com o objetivo de validar e tornar confiáveis os resultados gerados para as metodologias desenvolvidas é extremamente importante. O primeiro esforço neste sentido realizado no Instituto de Biologia Molecular do Paraná foi a construção de um controle interno para HCV baseado em plasmídeo (DUARTE, 2006). À época, inseriu-se a sequência de nucleotídeos da região 5' UTR do HCV em vetor pGEM (Promega). Este controle interno foi usado para gerar uma curva de calibração que foi otimizada na reação de PCR em tempo real e testada com amostras previamente submetidas a um teste de carga viral comercial. Os resultados obtidos foram satisfatórios, porém este tipo de controle interno por ser um DNA e não ter uma estrutura viral, não controla a fase de extração de ácido nucleico e nem de transcrição reversa.

Outro controle interno foi desenvolvido por Biomanguinhos e é um vírus calibrador recombinante, gerado pela substituição da metade do gene *nef* do HIV1 subtipo D, pelo gene da guanina fosforibosil transferase de *E. coli*, gerando um vírus inócuo no qual foi inserido sequências do HCV (TANURI *et al*, 2000). Este vírus é amplificado com os mesmos iniciadores desenhados para o HIV e o HCV e possui sondas específicas que permite distingui-lo da sequência alvo. Este vírus foi validado na reação de PCR em tempo real e pode controlar a fase de extração, amplificação e detecção, porém este controle pode se deparar com as questões envolvidas na utilização de vírus humanos. Além disto, a obtenção do vírus envolve técnicas de cultivo celular que são difíceis de serem padronizadas, requerem técnicos habilitados e laboratórios especiais.

Neste projeto, nós estamos propondo o desenvolvimento de um controle interno utilizando o bacteriófago MS2. O objetivo é inserir no genoma deste vírus um fragmento da sequência do vírus da hepatite C. A vantagem de se obter um controle interno baseado no bacteriófago MS2 em relação aos outros controles é que este vírus é inócuo para o ser humano, não infeccioso, resistente a degradação por RNases, fácil de ser produzido uma vez que não requer ambientes especializados e estável a longo prazo. Além disto o MS2 é um vírus RNA e desta forma pode controlar a fase de extração, amplificação e transcrição de uma metodologia por biologia molecular, uma vez que contém estruturas como vírus, é um vírus de bactéria. Além disto este controle é específico para o HCV.

A técnica de PCR em tempo real otimizada com o controle interno poderá representar uma alternativa às técnicas comerciais disponíveis utilizadas tanto com propósito diagnóstico, como na triagem em bancos de sangue, contribuindo para reduzir os quadros epidemiológicos da hepatite C em nosso país.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

- Amersham-Pharmacia Biotech: enzima fosfatase alcalina de camarão;
- BioRad: azul de bromofenol, xilenocianol;
- Fisher Scientific: meio de cultura Luria Bertani;
- Invitrogen: 1 Kb Plus DNA Ladder, TaqDNA Polimerase 5 U/ul, RNase OUT 40 U/ul, T4 DNA ligase 1 Weiss U/ml;
- Merck: acetato de sódio, ácido bórico, cloreto de cálcio, etanol absoluto, cloreto de sódio, ácido clorídrico, hidróxido de sódio;
- New England Biolabs: endonucleases de restrição *Bam*HI, *Eco*RI,,*Not*I, *Xba*I, *Xho*I, NEBuffers, BSA;
- Promega: transcriptase reversa, enzima GoTAQ™DNA Polymerase 5 U/ul, tampão de reação ImProm II 5X, MgCl₂ 25 mM, dNTP(s) 100 mM, vetor pGEM®-T Easy;
- Novagen: vetor pET-47b(+);
- Acrometrix: Painel Optiquant HCV RNA;
- Qiagen: QIAamp®viral RNA Kit, QIAamp®MinElute Virus Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, HiSpeed Plasmid Midi Kit;
- Applied Biosystem: TaqMan Universal Master Mix®, SYBR Green® Master Mix, TaqMan® One-Step RT - PCR Master Mix;
- Roche Molecular Biochemicals: High Pure PCR Product Purification Kit;
- Sigma - Aldrich: agarose, ampicilina, brometo de etídeo, canamicina, cloranfenicol, Hepes, tetraciclina.

3.2 SOLUÇÕES E TAMPÕES

- Brometo de etídeo 10 mg/ml;
- Tampão de amostra para eletroforese de DNA 6X: azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%, glicerol em água 30%;
- Tampão de amostra para eletroforese de DNA Ficoll 10X: Ficoll (tipo 400) 25%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol FF 0,25%;
- Tampão de lise celular para "tooth pick": glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM, NaOH 50 mM, azul de bromofenol;
- TBE 1X: Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM;
- TE: Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0;
- Acetato de sódio 3 M pH 5,3;
- IPTG (Isopropyl-1-Thio- β -D-galactosídeo) 1 M;
- CaCl_2 100 mM;
- Hepes 1 M pH 7,0;
- Tampão de CaCl_2 100 mM, Hepes 10 mM pH 7,0: 1 ml de Hepes pH 7,0 em 100 ml de CaCl_2 100 mM;
- Tampão SM: Tris-HCl 1 M pH 7,5, NaCl 5 M, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 M, gelatina 2 %.
- Solução do antibiótico ampicilina: 25 mg/ml;
- Solução do antibiótico canamicina: 25 mg/ml;
- Solução do antibiótico cloranfenicol: 34 mg/ml;
- Solução do antibiótico tetraciclina: 12,5 mg/ml.

3.3 MEIOS DE CULTURA

- Meio LB (Luria Bertani): triptona 10 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 5 g/l;
- Meio SOC: bactotriptona 20 g/l, extrato de levedura 5 g/l, NaCl 5 M 2 ml/l, KCl 0,5 M 5 ml/l, MgCl_2 1M 10 ml, MgSO_4 10 ml/l, glicose 1 M 10 ml/l;
- Meio LB/ ampicilina: meio LB contendo ampicilina 100 ug/ml;
- Meio LB/ canamicina: meio LB contendo canamicina 25 ug/ml;

- Meio LB/cloranfenicol: meio LB contendo cloranfenicol 34 ug/ml;
- Meio LB/ tetraciclina: meio LB contendo tetraciclina 12,50 ug/ml;
- Meio LB/ ampicilina/canamicina: meio LB contendo ampicilina 100 ul/ml e canamicina 25 ug/ml;
- Meio LB/ canamicina/cloranfenicol: meio LB contendo canamicina 25 ug /ml, cloranfenicol 34 ug/ml;
- Meio LB/amp/IPTG/X-Gal - Meio LB/Amp contendo IPTG 0,1 mM, X-Gal 0,002%.

3.4 ORGANISMOS

- *Escherichia coli* cepa DH5 α (F-, *recA1*, *endA1*, *hsdR17* (rk-, mk+), *supE44*, λ -, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, Φ 80/*lacZ_M15_(lacZYA-argF)*U169) para transformação e seleção de clones positivos;
- *Escherichia coli* cepa BL21(DE3)pLysS (F-, *ompT*, *hsdS_B* (r_B-, m_B-), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLyss, Cm^r) para expressão da proteína recombinante;
- *Escherichia coli* cepa XL1-Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1lac* (F' proAB *lacIqZ_M15 Tn10* (Tetr) para titulação do bacteriófago;
- *Escherichia coli* cepa Top10F' (*lacIq*, *Tn10*(TetR)) *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*, para transformação e seleção de clones positivos.*

3.5 EQUIPAMENTOS E ACESSÓRIOS

- Accujet: pipeta de dispensação;
- Amersham-Pharmacia Biotech: fonte de eletroforese EPS 301;
- Applied Biosystem: Gene Amp PCR System 9700, 7.500 Real Time PCR-System;

- Axygen: ponteiras 1 - 10 ul, 2 - 200 ul, 200 - 1000 ul. Tubos de 0,2 e 1,5 ml;
- BioAgency: cubetas de eletroporação;
- BioRad: eletroporador Gene Pulser II;
- Corning Incorporated: erlenmeyer 500 e 1000 ml;
- Elga: purificador de água Purelab/Máxima;
- Eppendorff: centrífugas modelo 5.415 D, 5.417 R, 5.418, 5.424, MiniSpin plus, pipeta de dispensação Easypet, Thermomixer Comfort, termociclador Mastercycler, Centrífuga de Placa modelo 5.810, Centrífuga refrigerada;
- Fanem: banho-maria modelos 102 R e 100, estufa incubador;
- Hitachi - ultra-centrífuga modelo SCR20B;
- Pharmacia: espectrofotômetro Ultraspectr II;
- Gilson: micropipetas pipetman P 2, P 10, P 200 e P 1000;
- National Labnet: vortex mixer S 1000;
- New Brunswick: shaker modelo Innova 4080;
- Ohaus corporation: balança modelo N0B110;
- Roper Scientific Photometrics: câmera CCD CoolSNAP-Pro cf color;
- Scie-Plas: sistema para eletroforese horizontal modelos HU 6, HU 10, HU 13;
- Sorval - centrífuga refrigerada modelo RC 5B Plus;
- Thermo Scientific: espectrofotômetro NanoDrop ND-1000;
- Veco-fluxo Laminar VLFS classe 2.

3.6 AMOSTRAS ESTUDADAS

Para a padronização dos testes de PCR em tempo real, foram utilizadas 7 amostras de plasma obtidas no Laboratório Central do Estado (Lacen) a partir de sangue total. Estas amostras de sangue total foram coletadas em tubos Vacutainer (Becton-Dickinson, Plymouth, United Kingdom), contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetracético) foram centrifugadas dentro de no máximo 2 horas e o plasma obtido foi separado em frasco livre de RNase(s) e DNase(s) e

acondicionado a - 20°C até o momento da extração do RNA. Estas amostras foram testadas no produto comercial Amplicor Monitor HCV 2.0® (Roche) antes do envio e têm as seguintes cargas virais, 682.000 UI/ml, 180.000 UI/ml, 1.270 UI/ml, 520.000 UI/ml, 5.318.000 UI/ml, 172.000 UI/ml e com 486.000 UI/ml.

Alguns testes foram feitos usando o painel comercial OptiQuant HCV RNA da Acrometrix (JORGENSEN *et al.*, 2001). Este painel contém 7 amostras do vírus da hepatite C proveniente de uma única fonte, ou seja de um único indivíduo infectado com HCV. As concentrações específicas de cada amostra foram ajustadas com soro humano.

Cada membro do painel, exceto o negativo, contém RNA viral do HCV em um nível pré-determinado, obtido em relação ao Padrão Internacional da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization (WHO) International Standard for HCV RNA) (SALDANHA *et al.*, 1999). Cada uma das amostras contém respectivamente 5.000.000, 500.000, 50.000, 5.000, 500, 50 e 0 UI/ml.

No momento do estudo preparou-se diluições destas amostras e dos controles internos em plasma humano negativo para anticorpos para HCV, HIV-1 e HIV-2, HTLV, HbsAg, HBc, Chagas e Sífilis e para a presença do antígeno p24 (HIV1 e do HIV-2). Este plasma é proveniente do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná, onde, foi submetido a testes sorológicos para a investigação da presença de anticorpos contra os patógenos acima listados através de ELISA.

3.7 CONSTRUÇÃO DO CONTROLE INTERNO

A metodologia empregada para a construção do controle interno utilizou o genoma do bacteriófago MS2, um RNA com 3.569 bases proveniente de fonte comercial (Roche), que foi amplificado em uma reação de RT-PCR. Com o produto da amplificação obtido foi feita a montagem do vetor de clonagem pGEM® T Easy - MS2. Os plasmídeos obtidos na clonagem foram usados na construção do vetor de expressão pET-47(b+) - MS2. No genoma do MS2 presente neste vetor, na região do gene replicase, foi ligada uma sequência sintética, específica para o vírus da hepatite C, gerando o pET-47(b+) - MS2 - sequência sintética (pET-47(b+) - MS2 - SS). O pET-47(b+) - MS2 e o pET-47(b+) - MS2 - SS foram usados para expressar o

bacteriófago MS2 (CI MS2) e o bacteriófago recombinante (controle interno competitivo), através da indução com IPTG. Os bacteriófagos obtidos foram purificados com polietilenoglicol e usados na reação de PCR em tempo real para o vírus da hepatite C.

3.8 RT PCR PARA O MS2

A RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) é uma técnica altamente sensível para detecção e quantificação de RNA e que ocorre em duas etapas. Na primeira etapa a enzima transcriptase reversa sintetiza DNA complementar ou cDNA usando RNA como molde, e na segunda etapa ocorre a amplificação do cDNA pela técnica de PCR.

As transcriptases reversas são enzimas usadas na natureza por retrovírus para gerar DNA a partir de RNA viral. No laboratório a transcriptase reversa é usada para converter RNA de qualquer origem para cDNA, que pode ser usado para múltiplos propósitos, incluindo aplicações baseadas em PCR. Transcriptases reversas, como a obtida do vírus da mieloblastose aviária e a do vírus da leucemia murina de Moloney, têm sido utilizadas.

Na transcrição reversa, sob condições apropriadas de reação, a quantidade relativa de cDNA gerado é proporcional à quantidade relativa de RNA molde.

O cDNA é amplificado por PCR, que é um procedimento através do qual o DNA pode ser copiado e amplificado pela enzima DNA polimerase, na presença de oligonucleotídeos curtos chamados de "primers". A DNA polimerase mais utilizada é a Taq DNA polimerase. Hoje estão disponíveis também enzimas de alta fidelidade, que têm a capacidade de reconhecer e corrigir erros. Desta forma estas enzimas minimizam a introdução incorreta de bases nos produtos de amplificação que serão clonados, sequenciados ou expressos.

3.8.1 Desenho de Oligonucleotídeos para Amplificação do MS2

Os "primers" para o MS2 foram desenhados baseando-se na sequência de nucleotídeos do genoma do bacteriófago MS2, ref. NC_001417.1, disponível no GenBank. Para a escolha das sequências dos oligonucleotídeos empregou-se o programa "Primer Select" do Software Lasergene (DNASTAR). Selecionou-se as sequências com menor probabilidade de formação de estruturas secundárias e de dimerização entre os oligonucleotídeos. Foram feitos "primers" para a amplificação do genoma em toda a sua extensão e para amplificação de fragmentos específicos que foram sendo utilizados durante o desenvolvimento do controle interno.

TABELA 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NO ENSAIO DE PCR PARA O MS2

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Região Genômica
CLONMS2-F	GGGTGGGACCCCTTTCGG	1 - 18
CLONMS2-R	TGGGTGGTAACTAGCCAAGCAG	3.548 - 3.569
MS2-F1	GGGTGGGACCCCTTTCG	1 - 17
MS2-R1	TGGGTGGTAACTAGCCAAG	3.551 - 3.569
MS2-F2	GTTACTGACGTAATAACGGGTGAG	1.096 - 1.119
MS2-R2	GATCCACGGCGCACATTG	2.262 - 2.279
MS2-F3	GGTCCGAGACCAATGTGC	2.252 - 2.269
MS2-R3	CTTATGATGGACTCACCCGTTATTAC	1.105 - 1.130
MS2-F4	GCAAAC TCCGGCATCTACTAATA	1.707 - 1.729
MS2-R4	GAATGGCCGGCGTCTAT	1.727 - 1.743
T7 "promoter"	GTAATACGACTCACTATAGGGC	^a

NOTA: ^a a sequência deste "primer" corresponde às bases da posição 437- 453 do vetor pET-47b(+)

3.8.2 Transcrição Reversa do Genoma do MS2

A síntese do cDNA correspondendo ao genoma inteiro do MS2 foi feita usando como molde o RNA comercial da Roche. Na reação foi colocado 1 µg do RNA comercial, 1 ul do "primer" reverso", CLONMS2-R (10 pmol/ul) e 3 ul de água ultra-pura, livre de RNase. A reação foi incubada em banho-maria a 70°C, por 10

minutos, e em seguida foi mantida a 4°C, durante 5 minutos. Adicionou-se então 15 ul da mistura de reação contendo 4ul do tampão de reação ImProm II 5X, 2,4ul de MgCl₂ 25 mM, 1 ul de dNTPs 10 mM, 1ul da enzima RNase OUT recombinante 40 U/ul e 1 ul da enzima transcriptase reversa ImProm II. A mistura foi incubada a 42°C, durante 1 hora e 15 minutos em termobloco, para a síntese do cDNA e em seguida foi colocada a 70°C, durante 15 minutos, para inativar a enzima transcriptase reversa não utilizada. O processo terminou com a adição de 0,5 ul de RNase H 1 U/ul que é uma enzima com capacidade de destruir as fitas de RNA hibridizadas com o cDNA recém sintetizado.

O mesmo protocolo foi usado para a transcrição reversa com os iniciadores MS2-R1, MS2-R2, MS2-R3 e MS2-R4. Estas reações foram usadas em diferentes momentos da clonagem e também nos sequenciamentos, que foram feitos durante o desenvolvimento do controle interno.

3.8.3 Padronização da Reação de PCR para Amplificação do Genoma Inteiro do MS2

Para a obtenção das 3.569 bases do genoma do MS2 diversos protocolos foram feitos. Um dos mais importantes, que serviu de base para a padronização final, foi a testagem de diversas concentrações de MgCl₂ e da enzima Taq DNA polimerase. Preparou-se tubos numerados de 1 a 8 e colocou-se em cada um 2,5ul de cDNA do MS2, 5 ul do "primer" MS2-F1 10 pmol/ul, 5 ul do "primer" MS2-R1 10 pmol/ul, 5 ul de tampão 10X, 4 ul de dNTP 2,5 mM. Adicionou-se respectivamente nos tubos de 1- 8, 1 ul de MgCl₂ 50 mM e 27 ul de água, 2 ul de MgCl₂ 50 mM e 26 ul de água, 4 ul de MgCl₂ e 24,1 ul de água, 6 ul de MgCl₂ e 22 ul de água, 8 ul de MgCl₂ e 20 ul de água, 10 ul de MgCl₂ e 18 ul de água, 2 ul de MgCl₂ e 25,5 ul de água, 4 ul de MgCl₂ e 23,5 ul de água. Nos tubos de 1 - 6 adicionou-se 0,5 ul da enzima Taq DNA polimerase com 5 U/ul e nos tubos 7 e 8 colocou-se 1 ul da mesma enzima. A amplificação das reações de 1 - 6 foram feitas a 94°C, durante 5 minutos e 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, e 72°C durante 4 minutos. Ao término dos ciclos a reação de PCR foi mantida a 72°C por 10 minutos. Para as reações 7 e 8 a amplificação utilizou-se a temperatura de anelamento de 57°C durante 1 minuto e os demais parâmetros cíclicos usados nas outras reações.

Baseando-se nestes protocolos testados elaborou-se a reação usando a enzima GoTAQ™ DNA Polymerase da Promega, que é uma nova formulação da Taq DNA Polymerase. A PCR foi otimizada em um volume total de 50 ul, contendo 10 ul de tampão Go TAQ® concentrado incolor 10X, 4 ul de dNTP 2,5 mM, 5 ul do "primer" CLONMS2-F 10 pmol/ul e 5 ul de CLONMS2-R 10 pmol/ul, 1 ul da enzima GoTAQ™DNA Polimerase 5 U/ul e 2,5 ul de cDNA obtido na reação de transcrição reversa. A mesma reação foi feita usando o par de iniciadores MS2-F1 e MS2-R1.

As reações foram colocadas no termociclador a 94°C, durante 5 minutos e foram submetidas a 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, e 72°C durante 4 minutos. Ao término dos ciclos a reação de PCR foi mantida a 72°C por 10 minutos para término da extensão das sequências, sendo então mantida a 4°C indefinidamente. A detecção e análise do produto de PCR foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e coloração com solução de brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Em cada poço do gel de agarose foram pipetados 5 ul do DNA amplificado de cada amostra adicionado de 2 ul de "loading buffer". Em outro poço foi colocado o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Após corrida eletroforética, a visualização das bandas foi feita em um transiluminador com luz ultra-violeta. Os fragmentos amplificados foram comparados com os do marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. A fotodocumentação foi realizada através de câmara digital (Kodak Digital Science - Eletrophoresis Documentation and Analysis System 120 Rochester, NY USA).

3.9 CORTE E PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR

Os 45 ul de produto de PCR obtidos no protocolo com a enzima GoTaq™ DNA Polymerase, foram aplicados em dois poços de um gel de agarose 0,8%. Em um terceiro poço foi colocado o 1 Kb Plus DNA Ladder. A eletroforese foi feita a 100 Volts. As bandas com 3.569 bases visualizadas no transiluminador foram cortadas do gel, colocadas em tubos Eppendorff e submetidas à purificação, usando o kit "High Pure PCR Product Purification Kit," conforme instruções do fabricante. Os produtos da purificação foram quantificados através de espectrometria (NanoDrop ND-1000).

3.10 CONSTRUÇÃO DO VETOR pGEM[®]-T Easy - MS2

3.10.1 Vetor pGEM[®]- T Easy (Promega)

O Vetor pGEM[®]-T Easy é um sistema próprio para clonagem de produtos de PCR. O vetor é preparado linearizado por corte na posição 60 da sua sequência de bases, com a enzima de restrição *EcoRV* e adição de timidinas nos terminais 3' em ambos os lados gerados pelo corte com a enzima de restrição. Estas timidinas no sítio de inserção melhoram a eficiência de ligação dos produtos de PCR ao plasmídeo prevenindo a recircularização do vetor e fornecendo uma terminação compatível para produtos de PCR gerados por certas polimerases que adicionam adenosina nas regiões 3' dos fragmentos amplificados. O vetor pGEM[®]-T Easy contém: os promotores T7 e SP6 para ligação da RNA polimerase, ladeando um sítio múltiplo de clonagem onde estão localizados sítios de restrição para diversas enzimas. Possui também o gene de resistência a ampicilina que é um marcador selecionável que irá assegurar que somente as bactérias que contém o plasmídeo, sejam capazes de sobreviver e multiplicar-se em um meio de cultura com quantidades tóxicas deste antibiótico, e o gene lac Z modificado.

O gene lac Z codifica a enzima β -galactosidase, que é uma das enzimas envolvidas na quebra de lactose em glicose mais galactose. Esta modificação no gene feita por técnicas de engenharia, durante a construção do vetor, não altera a expressão e a atividade funcional da enzima β -galactosidase codificada. Esta enzima pode hidrolizar o substrato X-Gal incolor (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo), quando adicionado ao meio de cultura produzindo um precipitado azul insolúvel. No entanto a inserção de um fragmento de DNA no vetor resulta na expressão de uma molécula não funcional de β -galactosidase, que é incapaz de hidrolizar X-Gal, presente no meio de cultura, produzindo colônias brancas. Desta forma o gene lac Z modificado representa um meio para distinguir clones contendo o plasmídeo recombinante, que não produzem a enzima β -galactosidase e por isso não degradam X-Gal no meio de cultura produzindo colônias brancas de clones que não contém o plasmídeo, produzem a enzima e hidrolisam X-Gal, produzindo colônias azuis.

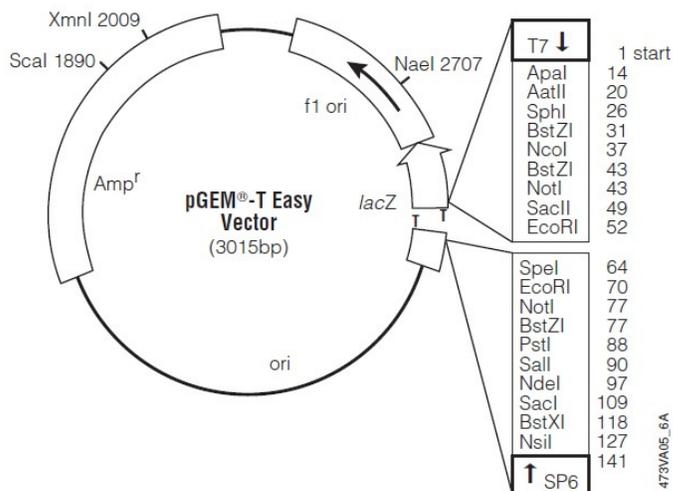


FIGURA 9 - MAPA CIRCULAR DO VETOR pGEM[®] - T Easy

FONTE: Manual Técnico da Promega (Technical Manual)

NOTA: Nome do plasmídeo: pGEM[®] - T Easy

Tamanho: 3.015 bp

Construído por : Promega Corporation, Madison, WI.

Alguns pontos de referência na sequência:

Sítio para início da transcrição pela enzima T7 RNA polimerase 1;

Múltiplos sítios de clonagem 10 - 113;;

Promotor para a RNA polimerase SP6 124 - 143

Sítio para início da transcrição pela RNA polimerase SP6 126;

Sítio para ligação ao "primer" de sequenciamento pUC/M13 161 -177

Codon de início do gene Lac Z 165;

Operador Lac 185 - 201;

Região de codificação da β lactamase 1322 - 2182;

Região do fago F1 2365 - 2820;

Sequências do operon Lac;

Sítios de ligação à "primers" de sequenciamento 2941 - 2957;

Promotor para a T7 RNA polimerase 2984 - 3.

3.10.2 Ligação do Fragmento de PCR ao Vetor pGEM[®] -T Easy

O processo de ligação corresponde à etapa inicial na construção de uma molécula de DNA recombinante e representa a união da molécula do vetor com o DNA a ser clonado, utilizando a enzima DNA ligase.

As DNA ligases são produzidas por todas as células vivas, mas a enzima utilizada em engenharia genética é geralmente purificada de bactérias *E. coli*. Nas células esta enzima têm por função reparar quaisquer descontinuidades, provenientes de quebras de ligações fosfodiéster, que venham a surgir em uma das

fitas de uma molécula de fita dupla. Em experimentos as DNA ligases, além de repararem descontinuidades, também podem unir moléculas de DNA individuais ou as duas extremidades de uma mesma molécula.

A ligação do fragmento do MS2 ao vetor foi feita usando a relação molar 1:3, ou seja, 1 parte do vetor para 3 partes do fragmento de PCR. A reação também incluiu 5 ul do tampão de ligação 2X para a enzima T4 DNA ligase e 1 ul da enzima T4 DNA ligase (3 Weiss U/ul), totalizando 10 ul. A reação foi incubada a 16°C, por 18 horas.

3.10.3 Transformação em Bactérias Cálcio Competentes

A transformação bacteriana é uma técnica que têm por objetivo introduzir uma molécula de DNA, que pode ser um plasmídeo (vetor), em uma bactéria e usar esta bactéria para amplificar o plasmídeo. As bactérias utilizadas neste processo, células competentes, são submetidas a tratamento físico e/ ou químico para aumentar sua capacidade de captação de DNA, ou seja, para que sua eficiência de transformação seja algumas ordens de grandeza superior a que ocorre na natureza, uma vez que a maioria das bactérias incorpora apenas quantidades limitadas de DNA sob circunstâncias normais. Neste desenvolvimento o produto da ligação pGEM[®]- T Easy foi transformado em *Escherichia coli* Top10F'.

Para preparar *Escherichia coli* Top10F' competente, resfriou-se uma cultura de células em fase exponencial de crescimento, e submeteu-se a mesma a tratamento com CaCl₂ 100 mM em tampão Hepes 10 mM pH 7,0 gelado e estéril. Após incubação no gelo e centrifugação, o sedimento bacteriano foi resuspenso também em solução de CaCl₂ 100 mM em tampão Hepes 10 mM pH 7,0 e glicerol a 10%, sendo as células estocadas a -70°C. O mecanismo desse tratamento ainda não é completamente entendido, porém é possível que o CaCl₂ provoque a precipitação do DNA sobre a superfície externa das células ou algum tipo de alteração na parede celular que favoreça a ligação ao DNA. Efetivamente ele não faz a incorporação desse DNA na célula. A efetiva movimentação do DNA para o interior das células competentes é estimulada por uma breve elevação da temperatura a 42°C, por mecanismos também não explicados.

Na construção do vetor pGEM[®]-T Easy - MS2, 5 ul da reação de ligação descrita no Item 3.10.2 foi transformada em 100 ul da Bactéria Top10F' competente. A mistura foi incubada no gelo durante 30 minutos, para ligação do DNA às células competentes. Após este período, a suspensão bacteriana foi submetida choque térmico a 42°C por 1 minuto, para a efetiva movimentação do DNA para o interior das células competentes. Imediatamente a mistura foi colocada no gelo por 2 minutos. Em seguida foi adicionado 1 ml de meio LB, sem antibiótico. As células transformadas foram incubadas sob agitação constante a 37°C, durante 1 hora, período este para a síntese e expressão do gene de resistência a ampicilina. Alíquotas de 100 ul de células competentes contendo enzimas de resistência em quantidade suficiente para a sobrevivência das células foram espalhadas em placas X-Gal/IPTG/Ampicilina, sendo o restante do material centrifugado durante 4 minutos a 4.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o material concentrado foi também espalhado nas placas que foram incubadas a 37° C por 18 horas.

3.10.4 Análise de Clones pela Técnica “Tooth Pick”

Esta técnica permite uma triagem rápida dos clones bacterianos contendo o plasmídeos com inserto. Trinta e oito colônias bacterianas brancas, resistentes à ampicilina e incapazes de produzir β -galactosidase foram selecionadas e transferidas para uma placa de meio sólido contendo X-Gal/IPTG/Ampicilina. Cada uma foi colocada em um espaço numerado. A placa foi incubada por 18 horas a 37°C. Após este período cada clone foi removido da placa com auxílio de pálito estéril e depositado no fundo de tubo Eppendorff numerado de acordo com o clone recebido. Para liberar o plasmídeo do interior da bactéria, adicionou-se a cada tubo 15 ul de tampão de lise contendo 5 ul de hidróxido de sódio 10 M, 100 ul de glicerol a 50%, 50 ul de SDS (dodecil sulfato de sódio a 10%), 10 ul de EDTA 0,5 M, 835 ul de água ultra-pura, e uma pequena quantidade de azul de bromofenol. A mistura foi incubada em termobloco a 65°C, durante 10 minutos. O material de cada tubo foi aplicado em poços individuais de um gel de agarose a 1%. Para facilitar a identificação dos clones recombinantes, foi colocado no gel 5 ul do vetor GFP, com aproximadamente 7.000 bases. A eletroforese foi feita utilizando uma voltagem de aproximadamente 100 volts.

3.10.5 Preparação de Plasmídeo em Pequena Escala (Miniprep)

O clone recombinante foi cultivado, em 3 ml de meio LB/ampicilina. Os dois tubos preparados foram incubados durante 16 - 18 horas, com agitação a 37°C. A cultura líquida resultante foi colocada em tubo de 1,5 ml e centrifugada durante 5 minutos a 4000 x g. A partir do sedimento bacteriano foram obtidos e purificados plasmídeos utilizando o Kit “QIAprep Spin Miniprep” da Qiagen, cujo protocolo compreende um procedimento de lise alcalina para rompimento das bactérias, ligação do DNA do plasmídeo liberado a uma resina de troca aniônica, sob baixa concentração de sais e condições apropriadas de pH, remoção de impurezas com baixo peso molecular, RNA, proteínas, corantes através de lavagem em um meio tamponado, eluição do plasmídeo em um tampão com altas concentrações de sais e concentração e purificação por precipitação com isopropanol. Para fazer o protocolo foram seguidas as instruções do fabricante.

3.10.6 Comprovação da Construção do Plasmídeo pGEM[®]-T Easy - MS2 com Enzimas de Restrição

Enzimas de restrição são endonucleases sintetizadas por bactérias, com atividades extremamente específicas. Hoje mais de 1.200 enzimas já foram caracterizadas. Cada uma delas reconhece e cliva uma sequência específica em uma molécula de DNA, mantendo intacta qualquer outra sequência. Estas enzimas são muito úteis, por exemplo, na clonagem gênica na qual um vetor deve ser clivado em uma única posição, para abrir o círculo de modo que possa ser inserida uma nova molécula de DNA.

Neste trabalho estas enzimas foram usadas para comprovar a construção do plasmídeo pGEM[®]-T Easy - MS2. Utilizando o programa NEBcutter V2.0 ([tools.neb.com/NEBcutter 2](http://tools.neb.com/NEBcutter2)), foram escolhidas duas enzimas de restrição, *NotI*, derivada da bactéria *E. coli* que carrega o gene *NotI* da bactéria *Nocardia otitidis-caviarum* (ATCC

14630), que reconhece a sequência 5' GC▼GGCCGC3', e a *EcoRI*, proveniente da *E.coli* com a sequência de reconhecimento 5'G▼AATTC3'.

Foram colocados 4 ul de solução de plasmídeos (500 ng), 3 ul de tampão NEBuffer 3, 0,3 ul de BSA 100X, 1 ul de enzima *NotI* (10 U/ul) e 21,7 ul de água. Em outro tubo foi preparada a mesma reação e foi adicionado 1 ul da enzima *EcoRI*. As reações foram incubadas a 37°C, por 18 horas. As enzimas utilizadas são provenientes da empresa Biolabs e o protocolo é o recomendado pelo fabricante. Para análise do resultado as reações foram submetidas a eletroforese usando gel de agarose a 1%.

3.11 CONSTRUÇÃO DO VETOR pET- 47b(+)-MS2

3.11.1 Sistema pET

O sistema pET é um sistema, desenvolvido para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Genes alvo são clonados em plasmídeos pET sob controle de um fator transcricional derivado do bacteriófago T7. Expressão é induzida fornecendo uma fonte de enzima T7 RNA polymerase que geralmente é proveniente da célula bacteriana hospedeira do vetor. Quando a T7 RNA polimerase é induzida com concentrações ótimas de um indutor, a grande maioria das células presentes são ativadas para a expressão do gene alvo. Entretanto baixando-se a concentração do indutor o nível de expressão pode ser atenuado, e em um estado não induzido o sistema pode manter genes transcricionalmente silenciosos.

Genes alvo são inicialmente clonados usando hospedeiros que não contem o gene da enzima T7 RNA polymerase, evitando-se assim a expressão de proteínas que podem ser tóxicas para a célula do hospedeiro. Uma vez clonado o gene, a expressão da proteína alvo pode ser iniciada infectando o hospedeiro com λ CE6, um fago que carrega o gene da enzima T7 RNA polimerase sob controle dos promotores λ pL e p1, ou transferindo o plasmídeo para um hospedeiro de expressão contendo uma cópia cromossomal do gene da T7 RNA polimerase, sendo neste caso a expressão induzida pela adição de IPTG (isopropiltiogalactosídeo) ou lactose à cultura bacteriana. O IPTG é um indutor do operon Lac, que atua ligando-se

fortemente ao repressor deste operon, impedindo sua ligação ao mesmo. A dissociação da ligação do repressor ao operador gera alterações conformacionais no operador que favorece a ligação da enzima T7 RNA polimerase ao promotor, tornando possível então a transcrição dos genes inseridos a jusante do mesmo.

3.11.2 Vetor pET-47b(+)

O pET-47b(+), com 5.203 pares de bases, é um vetor de expressão e portanto contém sinais que são reconhecidos pela bactéria. Esses sinais são sequências curtas de nucleotídeos que informam a presença do gene a ser transcrito e fornecem instruções para os aparatos de transcrição e tradução da célula bacteriana. Os três sinais mais importantes são o promotor, o terminador e o sítio de ligação do ribossomo.

O pET-47b(+) contém o promotor T7 que corresponde à sequência de nucleotídeos nas posições 437 - 453. Adjacente ao promotor T7 está localizado o operon Lac. O códon de iniciação, reconhecido pelo ribossomo está localizado na posição 436, e o terminador T7 encontra-se nas posições 26 - 73. O terminador T7, marca o ponto no final do gene onde a transcrição deve parar e é uma sequência nucleotídica capaz de parear com ela mesma, formando uma estrutura de alça com haste.

O pET-47b(+) contém também sítios de restrição para clonagem de insertos em uma orientação definida e também as "tags", que são sequências que codificam peptídeos específicos. Esses peptídeos são expressos no momento da expressão da proteína desejada, formando-se assim uma proteína de fusão constituída pela proteína de interesse, e pelo peptídeo tag. Estes peptídeos são usados como alvos no momento do isolamento e purificação da proteína expressa. Os "tags" portanto são domínios que facilitam a purificação econômica e eficiente de proteínas expressas em qualquer escala e sob muitas condições.

Como marcador seletivo neste vetor está presente o sítio de resistência à canamicina.

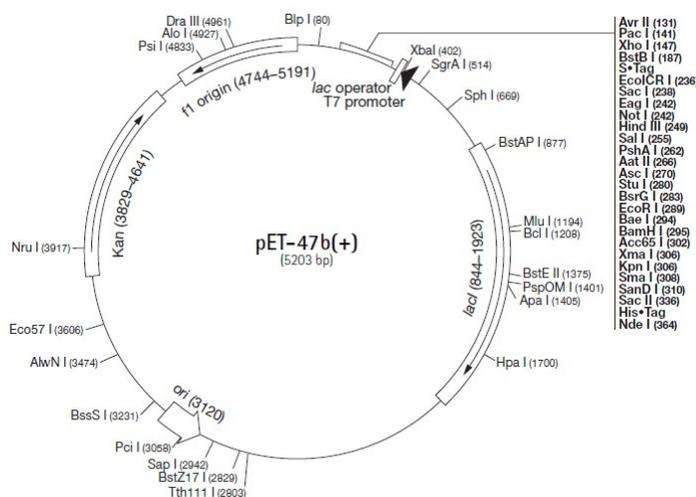


FIGURA 10 - MAPA CIRCULAR DO VETOR pET-47b(+)

NOTA: Nome do plasmídeo: pET-47b(+)

Tamanho: 5.203 bp

Construído por: Novagem

Alguns pontos de referência na sequência:

Promotor T7 437 - 453;

Sítio para início da transcrição pela enzima T7 436

Múltiplos sítios de clonagem 131 - 315

Sequências His Tag 341 - 359

Sequência S Tag 168 - 212

Terminador T7 26 - 73

Sequência para codificação do *lacI* 844 - 1923

pBR322 ori 3120

Origem F1 4744 - 5191

3.11.3 Preparo do Vetor pET-47b(+)- Geração de “Blunt Ends”- Extremidades Cegas

O primeiro procedimento realizado teve por objetivo a remoção do sítio de restrição da enzima *Bam*HI, presente no vetor. Isto porque esta enzima foi escolhida para digerir o genoma do bacteriófago MS2 no momento da inserção da sequência sintética.

Inicialmente foi analisada a sequência do vetor e foram selecionadas as enzimas *Xba*I, proveniente de uma bactéria *E.coli* que carrega o gene da bactéria *Xanthomonas badrii* (ATCC 11672) e com sítio de reconhecimento 5'T▼CTAGA3' e *Xho*I derivada de *E. coli* carregando o gene da *Xanthomonas holcicola* (ATCC13461), com sequência de reconhecimento 5'C▼TCGAG3'.

Na digestão com estas enzimas foram usados 12 ul do plasmídeo pET-47b(+), 4 ul do NEBuffer 2 (2X), 0,4 ul de BSA (100 X), 1 ul da enzima *Xba*I

(20 U/ul), 1 ul da enzima *Xho*I (20 U/ul) e 21,6 ul de água, totalizando um volume final de 40 ul. A reação foi incubada a 37°C, por 18 horas. Em seguida as enzimas foram inativadas a 65°C durante 20 minutos.

O produto da digestão foi colocado em gel de agarose e a eletroforese foi feita a 100 Volts. Foram obtidos dois fragmentos, um pequeno com 255 bases correspondendo a sequência de nucleotídeos entre os sítios de restrição de *Xba*I e *Xho*I e outro com aproximadamente 4.900 bases que correspondem ao restante do plasmídeo. Este fragmento maior foi cortado do gel e submetido à purificação, usando o Kit "High pure PCR purification kit".

Na sequência o material obtido foi submetido ao método "Fill in" para criação dos finais "blunt ends", nos fragmentos de fita única gerados pela clivagem com as enzimas de restrição *Xba*I e *Xho*I. Nesta técnica foi usada a enzima "Klenow fragment of DNA polymerase I," com capacidade de fazer a adição de nucleotídeos, ou seja, a síntese da fita complementar. Foi feito o seguinte protocolo: 40 ul do produto da digestão, 4 ul de dNTP(s) 2,5 mM, 0,5 ul de DNA polimerase I ("Klenow Fragment" 5 U/ul), água 5,5 ul e incubação à temperatura ambiente durante 15 minutos.

O pET-47b(+) com extremidades "blunt ends" foi então submetido a técnica de defosforilação para remoção dos grupos fosfato normalmente presentes nas terminações 5' das moléculas de DNA. Utilizou-se com este propósito a enzima fosfatase alcalina de camarão (SAP - Shrimp alkaline phosphatase), que é uma enzima que têm a propriedade de remover grupos fosfato de muitos tipos de moléculas, incluindo nucleotídeos e proteínas. A remoção destes grupos previniu a re-circularização do vetor, mantendo o mesmo linearizado, facilitando desta forma a ligação do fragmento de DNA a ser inserido. Na técnica, os 40 ul de solução contendo o vetor foram tratados com 4,5 ul de tampão 10X (específico para a enzima), e 0,5 ul da enzima SAP e incubação por 30 minutos. Em seguida a enzima foi inativada por incubação da reação a 65°C e foi feita a eletroforese de 5 ul da solução do fragmento obtido, que foi colocado em agarose gel a 1%.

3.11.4 Preparo do Fragmento - Genoma do MS2

O genoma do MS2, com 3.569 bases, foi retirado do vetor pGEM[®]- T Easy - MS2, usando a enzima de restrição *Not*I. 6 µg de solução pGEM[®]T Easy - MS2 foi colocado em um meio contendo 4 ul de NEBuffer 3 (10X), 0,4 ul de BSA (100X), 3 ul de enzima *Not*I (10 U/ul), água 10,6 ul, totalizando um volume de 40 ul. A digestão

foi feita a 37°C, durante 18 horas. Em seguida a enzima *NotI* foi inativada através de incubação a 65°C, durante 20 minutos. A análise da clivagem de restrição foi feita através de eletroforese usando agarose gel a 1%, a 100 V. Foram obtidas duas bandas, uma com 2.980 bases correspondendo ao vetor e outra com 3.604 bases correspondendo ao genoma do bacteriófago mais 35 bases do vetor. A banda com 3.604 bases foi cortada do gel e o ácido nucleico foi submetido à purificação utilizando o Kit "High pure PCR purification kit", usando as instruções do fabricante.

O eluído final desta purificação foi submetido à técnica "Fill-in", para preenchimento das terminações 3' formadas pela digestão com a enzima *NotI* e geração das extremidades "blunt ends" que foram ligadas aos "blunt ends" do vetor pET-47b(+). Foi usado o mesmo protocolo da técnica "Fill in" descrito no 3.11.3 no preenchimento das extremidades do pET-47b(+). 5 ul da solução do fragmento obtido foi colocado em gel agarose a 1%, e a eletroforese foi feita a 100 Volts.

3.11.5 Ligação pET-47b(+) - MS2

A ligação do fragmento correspondendo ao genoma do MS2, obtido do vetor pGEM[®]T Easy - MS2, ao vetor pET- 47b(+), foi feita usando 4,3 ul do MS2 com concentração 37,1 ng/ul e 4,3 ul do vetor pET-47b(+), com 44,7 ng/ul. Foram colocados também na reação 2,4 ul de tampão 5X para a enzima T4 DNA ligase, 1 ul da enzima T4 DNA Ligase com 1 U/ul. A reação foi incubada durante por 18 horas, a 15°C.

3.11.6 Transformação da Ligação pET-47b(+) - MS2

A transformação da ligação pET-47b(+) - MS2 foi feita usando a célula Top10F' eletrocompetente e utilizou-se o processo de eletroporação para incorporar o vetor nas células.

A eletroporação consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte de membrana, promovendo uma forma transitória de poros aquosos (“aquaporinas”) na bicamada lipídica, permitindo que macromoléculas migrem através destes poros. A eficiência do transporte depende dos parâmetros elétricos como frequência de pulso, formato de onda, intensidade do campo elétrico aplicado. As células competentes usadas neste processo precisam ser submetidas a um tratamento prévio.

Neste tratamento as bactérias Top10F' foram crescidas até a fase log, em seguida foram centrifugadas, e então lavadas extensivamente utilizando tampão com baixas concentrações de sais para reduzir a força iônica da suspensão bacteriana. As células com concentração de 3×10^{10} células/ml, foram resuspensas em glicerol a 10%, congeladas em gelo seco e estocadas a -70°C .

Na transformação, 5 ul da reação de ligação feita no Item 3.11.5 foram colocados junto com 100 ul de células Top10F' eletrocompetentes. Todo o conteúdo foi colocado na cubeta do equipamento eletroporador (*E.coli* Pulser cuvettes), que foi submetida a um pulso de 2.500 volts. Após o pulso foi colocado na cubeta 1 ml de meio SOC. O material foi então transferido para um tubo eppendorff e incubado a 37°C , com agitação, durante uma hora para recuperação e propagação das células contendo plasmídeos. As células foram então plaqueadas utilizando placas com meio LB/canamicina. Foram feitas duas placas com 100 ul e 200 ul que foram incubadas a 37°C , por 18 horas. Selecionou-se destas placas 150 clones, que foram distribuídos em outras 4 placas com meio LB/canamicina. Após incubação a 37°C , por 18 horas os clones foram submetidos a técnica de palitagem descrita no Item 3.10.4. Foi usado como controle o vetor pET-47b(+), com 5.203 bases.

3.11.7 Preparação de Plasmídeo em Pequena Escala (Miniprep)

O clone recombinante foi cultivado, em 9 ml de meio LB/canamicina. O tubo preparado foi incubado durante 16-18 horas, com agitação a 37°C . Após a incubação a cultura líquida resultante foi centrifugada e os plasmídeos foram obtidos

usando o Kit "QIAprep Spin Miniprep Kit" da Qiagen, conforme descrito no Item 3.10.5. Obteve-se 150 ul de solução de plasmídeo.

O clone recombinante foi repicado em uma placa de LB/canamomicina, que foi incubada a 37°C, por 18 horas. Esta placa foi mantida em geladeira, visando facilitar procedimentos posteriores, usando este clone.

3.11.8 PCR para Confirmação da Inserção do MS2 no pET-47b(+)

Foram feitas 6 reações de PCR para confirmação da inserção do genoma do MS2 no plasmídeo pET-47b(+). Nestas reações foram usados os iniciadores desenhados para o bacteriófago MS2, que estão descritos no Item 3.8.1. A solução de plasmídeo do clone selecionado foi diluída 1:10. Foram preparados 6 tubos de PCR, colocando sequencialmente 5 ul dos "primers" F "forward" e 5 ul dos "primers" R "reverso", todos com 10 pmol/ul. No tubo 1 foi colocado o MS2-F2 e o MS2-R2. No tubo 2 o MS2-F1 e o MS2-R4. No tubo 3 o MS2-F4 e o MS2-R1. No tubo 4 o MS2-F4 e o MS2-R2. No tubo 5 o MS2-F1 e o MS2-R1 e no tubo 6 CLONMS2-F1 e CLONMS2-R1. A cada tubo foi adicionado 1 ul da solução de plasmídeo do clone selecionado, 4 ul de água e 35 ul da mistura de reação contendo 5 ul de tampão Promega 10X, 4 ul de MgCl₂ 50 mM, 4 ul de dNTP(s) 2,5 mM, 0,5 ul de enzima Taq DNA Polimerase 5 UI/ul e 21,5 ul de água ultra-pura. As reações 1, 2, 3 e 4 foram amplificadas no termociclador, usando os seguintes parâmetros cíclicos: 94°C, durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C, 30 segundos, 56°C, 30 segundos, e 72°C por dois minutos. A fase de extensão foi feita a 72°C, 10 minutos. As reações 5 e 6 foram amplificadas em condições similares, porém o anelamento foi feito a 55°C, 1 minuto e a extensão a 72°C durante 4 minutos. Estas reações foram otimizadas previamente. Para a detecção dos produtos de PCR foi feita eletroforese em gel de agarose 0,8% e coloração com brometo de etídeo 0,5 µg/ml. Em cada poço do gel foram pipetados 5 ul do material amplificado, 2 ul de "loading buffer" com glicerol 10X e o marcador de peso molecular 1 Kb Plus. Na eletroforese utilizou-se 100 volts. A visualização das bandas foi realizada em transiluminador ultra-violeta.

3.11.9 PCR para Verificar a Orientação da Inserção no Plasmídeo

Foram feitas 4 reações de PCR para verificar se a ligação do MS2 no plasmídeo ocorreu no sentido 5' - 3'. Foi utilizado o "primer" T7 promotor da Stratagene em combinação com quatro "primers" R, todos com uma concentração 10 pmol/ul e com sequências descritas na Tabela 1. Foram identificados 4 tubos R1, R2, R3, R4. No tubo R1 foi colocado 2,5 ul de "primer" MS2-R1, no R2 foi adicionado 2,5ul de MS2-R2, no R3 2,5 ul de MS2-R3 e no R4 2,5 ul de MS2-R4. A cada tubo foi adicionado 2,5 ul do "primer" T7, 1 ul do plasmídeo pET-47b(+) - MS2, diluído 1:5, 9 ul de água e 34,5 ul de mistura de reação contendo 5 ul de tampão 10X Promega, 4 ul de dNTP 2,5 mM, 2 ul de cloreto de magnésio 50 mM, e água para biologia molecular 23,5 ul. Na amplificação no termociclador, utilizou-se os parâmetros cíclicos: 94°C 3 minutos e 35 ciclos a 94°C, 30 segundos, 54°C, 30 segundos, e 72°C durante 3 minutos. A extensão final foi feita a 72°C, 10 minutos. A detecção do material amplificado foi feita conforme descrito no Item 3.11.8.

3.11.10 Sequenciamento do Vetor pET47b(+) - MS2

Preparou-se 30 ul de uma solução contendo 0,1 ug/ul do plasmídeo pET47b(+)-MS2. Esta solução foi enviada para a empresa MacroGen na Korea, onde foi feito o sequenciamento usando os "primers" MS2-F2, MS2-R2, MS2-F3 e MS2-R3.

3.11.11 Transformação do Vetor pET-47b(+) - MS2 em BL21(DE3)pLysS

O plasmídeo que foi obtido no Item 3.11.7, foi transformado em *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Colocou-se 1 ul da solução contendo 0,14 µg do plasmídeo em 100 ul de células competentes.

A BL21 é uma célula que permite a expressão de proteínas com alta eficiência de qualquer gene que esteja sob o controle de um promotor T7 e que tenha um sítio de ligação para o ribossomo. BL21 carrega um fragmento de DNA contendo o gene lac I do bacteriófago T7, o promotor lac UV5 e o gene para a T7 RNA polimerase. BL21 também contém um plasmídeo, pLysS, que têm o gene

codificando a T7 lisozima. A T7 lisozima baixa o background do nível de expressão dos genes alvo sob o controle do promotor T7, mas não interfere no nível de expressão alcançada após a indução por IPTG.

A transformação foi feita usando protocolo descrito no Item 3.10.3. Foram plaqueados 10 ul, 50 ul e 100 ul da BL21 transformada em placas LB/canamicina /cloranfenicol. Cinquenta clones foram transferidos para uma placa nova, numerada de LB canamicina/cloranfenicol. Esta placa foi incubada a 37°C, por 18 horas sendo em seguida mantida em geladeira.

3.12 MONTAGEM pET-47b(+) - MS2 - SEQUÊNCIA SINTÉTICA

Com o objetivo de construir um controle interno específico para o vírus da hepatite C, foi ligado no genoma do MS2, presente no vetor pET-47b(+) - MS2, uma sequência sintética, derivada da sequência de nucleotídeos da região 5' UTR do HCV. O ponto de inserção desta sequência foi cuidadosamente escolhido analisando-se cada gene do genoma do MS2, bem como suas funções, e considerando-se que a presença desta sequência não deveria alterar os processos de transcrição, tradução e montagem das partículas virais e que os bacteriófagos gerados a partir deste gene fossem incapazes de se replicar e infectar bactérias. Por isso foi escolhido o gene para a enzima RNA replicase. A RNA replicase é uma enzima essencial no momento da replicação do material genético.

Depois de se definir o gene para a ligação da sequência sintética foi selecionado, com o auxílio do programa "NEBcutter" V2, a enzima de restrição *Bam*HI, com sítio de reconhecimento único na sequência de nucleotídeos do bacteriófago MS2 como ponto de inserção da sequência sintética no gene da enzima RNA replicase do MS2. Como esta enzima não deve cortar nenhuma outra região na montagem pET-47b(+) - MS2, e o vetor pET-47b(+) têm sítio de restrição para a mesma, este precisou ser removido antes da construção do pET47b(+) - MS2, conforme descrito no Item 3.11.3.

Na Figura 11 está disponível a sequência de nucleotídeos dos genes do bacteriófago MS2. A sequência em azul corresponde ao gene da proteína de maturação, em rosa a proteína do envoltório. A sequência sublinhada corresponde ao gene da proteína de lise, a em cinza ao gene da proteína RNA replicase, e o sítio da enzima de restrição *Bam*HI escolhido para a inserção da sequência sintética é a sequência em vermelho.

```

>GGGTGGGACCCCTTTCCGGGGTCTGCTCAACTTCCTGTCGAGCTAATGCCATTTTTAATGTCCTTTAGCGAGACGCTA
CCATGGCTATCGCTGTAGGTAGCCGGAATTCATTCCCTAGGAGGTTTGACCT.GTG.CGA.GCT.TTT.AGT.ACC.CTT.GAT.AGG.G
AG.AAC.GAG.ACC.TTC.GTC.CCC.TCC.GTT.CGC.GTT.TAC.GCG.GAC.GGT.GAG.ACT.GAA.GAT.AAC.TCA.TTC.TCT.TTA.AAA.
TAT.CGT.TCG.AAC.TGG.ACT.CCC.GGT.CGT.TTT.AAC.TCG.ACT.GGG.GCC.AAA.ACG.AAA.CAG.TGG.CAC.TAC.CCC.TCT.CC
G.TAT.TCA.CGG.GGG.GCG.TTA.AGT.GTC.ACA.TCG.ATA.GAT.CAA.GGT.GCC.TAC.AAG.CGA.AGT.GGG.TCA.TCG.TGG.GGT.
CGC.CCG.TAC.GAG.GAG.AAA.GCC.GGT.TTC.GGC.TTC.TCC.CTC.GAC.GCA.CGC.TCC.TGC.TAC.AGC.CTC.TTC.CCT.GTA.A
GC.CAA.AAC.TTG.ACT.TAC.ATC.GAA.GTG.CCG.CAG.AAC.GTT.GCG.AAC.CGG.GCG.TCG.ACCGAAGTCCTGCAAAGGTAC
CCAGGGTAATTTAACCTTGGTGTGCTTTAGCAGAGGCCAGGTGACAGCCTCACAACCTGCGAGCAAACATTGCGCTCGT
GAAGGCGTACACTGCCGCTCGTCGCGGTAATTGGCGCCAGGCGCTCCGCTACCTTGCCCTAAACGAAGATCGAAAGTTTCGAT
CAAAACACGTGGCCGGCAGGTGGTTGGAGTTGCAGTTCCGTTGGTTACCATAATGAGTGATATCCAGGGTGCATATGAGATG
CTTACGAAGGTTACCTTCAAGAGTTTCTTCTATGAGAGCCGTACGTCAGGTCCGTTACTAATCAAGTTAGATGGCCGTCTGT
CGTATCCAGCTGCAAACCTCCAGACAACGTGCAACATATCGCGACGTATCGTGATATGGTTTTACATAAACGATGCACGTTTGGC
ATGGTTGTCGTCTAGGTATCTGAACCCACTAGGTATAGTGTGGGAAAAGGTGCCTTTCTATTCTGTGCGACTGGCTCCTA
CCTGTAGGTAACATGCTCGAGGGCCTTACGGCCCCGTGGGATGCTCCTACATGTCAGGAACAGTTACTGACGTAATAACGGG
TGAGTCCATCATAAGCGTTGACGCTCCCTACGGGTGGACTGTGGAGAGACAGGGCACTGCTAAGGCCAAATCTCAGCCATGC
ATCGAGGGGTACAATCCGTATGGCCAACAACCTGGCGCGTACGTAAGTCTCCTTTCTCGATGGTCCATACCTTAGATGCGTTAG
CATTAAATCAGGCAACGGCTCTCTAGATAGAGCCCTCAACCGGAGTTGAAGCATGGCTTCTAACTTTACTCAGTTCGTTCTCGTC
GACAAATGGCGGAACCTGGCGACGTGACTGTGCCCCAAGCAACTTCGCTAACGGGGTCGCTGAATGGATCAGCTCTAACTCGCG
TTCACAGGCTTACAAAGTAACCTGTAGCGTTGTCAGAGCTCTGCGCAGAATCGCAAATACCCATCAAAGTCGAGGTGCCTAA
AGTGGCAACCCAGACTGTTGGTGGTGTAGAGCTTCTGTAGCCGCATGGCGTTCGTAATTAATGGAACTAACCATTCCAAT
TTTTCGCTACGAATCCGACTGCGAGCTTATTGTTAAGGCAATGCAAGGTCTCCTAAAAGATGGAAACCCGATTCCCTCAGCAATC
GCAGCAAACCTCCGGCATCTACTAATAGACGCCGGCCATTCAAACATGAGGATTACCCATGTGCAAGACAACAAAGAAGTTCAAC
TCTTTATGTATTGATCTTCTCGCGATCTTCTCTCGAAATTTACCAATCAATTGCTTCTGTGCGTACTGGAAGCGGTGATCCGCA
CAGTGACGACTTTACAGCAATTGCTTACTTAAGGGACGAATTGCTCACAAGCATCCGACCTTAGGTTCTGGTAATGACGAGGC
GACCCGTGCTACCTTAGCTATCGCTAAGCTACGGGAGGCGAATGGTGTATCGCGGTGAGATAAATAGAGAAGGTTTCTTACATGA
CAAATCCTTGTATGGGATCCGGATGTTTTACAAACCAGCATCCGTAGCCTTATTGGCAACCTCCTCTCTGGCTACCGATCGTC
GTTGTTTGGGAATGCACGTTCTCCAACGGTGTCTATGGGGCACAAGTTGCAGGATGCAGCGCCTTACAAGAAGTTCGCTG
AACAAGCAACCGTTACCCCGCGCTCTGAGAGCGGCTCTATTGGTCCGAGACCAATGTGCGCGTGGATCAGACACGCGGT
CCGCTATAACGAGTCATATGAATTTAGGCTCGTTGTAGGGAACGGAGTGTTTACAGTCCGAAGAATAATAAATAGATCGGGCT
GCCTGTAAGGAGCCTGATATGAATATGACCTCCAGAAGGGGTCCGGTCTTTCATCAGACGCCGGCTCAAATCCGTTGGTATA
GACCTGAATGATCAATCGATCAACCAGCGTCTGGCTCAGCAGGGCAGCGTAGATGGTTCGCTTGCAGCATAGACTTATCGTCT
GCATCCGATTCCATCTCCGATCGCCTGGTGTGGAGTTTTCTCCACCTGAGCTATATTCATATCTCGATCGTATCCGCTCACACT
ACGGAATCGTAGATGGCGAGACGATACGATGGGAACATTTTCCACAATGGGAAATGGGTTACATTTGAGCTAGAGTCCATGA
TATTCTGGGCAATAGTCAAAGCGACCCAAATCCATTTTGGTAACGCCGAACCATAGGCATCTACGGGGACGATATTATATGTC
CCAGTGAGATTGACCCCGTGTGCTAGAGGCACCTTCCCTACTACGTTTTAAACCGAATCTTCGTAACAACTTCGTGTCGGGGC
TCTTTGCGAGAGCTGCGGCGCGCACTTTTACCGTGGTGTGATGTCAAACCGTTTTACATCAAGAAACCTGTTGACAATCTCTT
CGCCCTGATGCTGATATTAATCGGCTACGGGGTTGGGAGTTGTGCGAGGTATGTCAGATCCACGCCCTATAAGGTGTGGG
TACGGCTCTCCTCCAGGTGCCTTGATGTTCTCGGTGGGACGGACCTCGCTGCCGACTACTACGTAGTCAGCCCGCTACG
GCAGTCTCGGTATACCAAGACTCCGTACGGGGCGCTGCTCGCGATACCCGTACCTCGGGTTCCGCTTGTGCTGATCGC
TCGAGAACGCAAGTTCTTCAGCGAAAAGCACGACAGTGGTCTACATAGCGTGGTCCATACTGGAGGTGAAATCACCGACA
GCATGAAGTCCGCCGGCGTGCAGTTATACGCACTTCGGAGTGGCTAACGCCGGTCCACATTCCCTCAGGAGTGTGGGCC
AGCGAGCTCTCCTCGGTAGCTGACCGAGGGACCCCGTAAACGGGGTGGGTGTGCTCGAAAGAGCACGGGTGCGAAAGCGG
TCCGGCTCCACCGAAAGGTGGGCGGGCTTCGGCCAGGGACCTCCCCCTAAAGAGAGGACCCGGGATTCTCCCGATTTGGTA
ACTAGCTGCTTGGCTAGTTACCACCCA

```

FIGURA 11 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENOMA DO BACTERÍOFAGO MS2

FONTE : "National Center for Biotechnology", *GenBANK* ref NC_001417.1

NOTA: O gene da proteína de maturação está representado em azul, o gene da proteína do envoltório em rosa, o gene da proteína de lise está sublinhado em preto e o gene da proteína replicase em cinza. O sítio de reconhecimento da enzima *Bam*HI, ponto de inserção da sequência sintética está mostrado em vermelho.

3.12.1 Desenho da Sequência Sintética

A sequência sintética usada na construção do controle interno, foi desenhada baseando-se na sequência da região 5' UTR do HCV posições 130 a 273 totalizando 144 bases. Utilizou-se a sequência do *GenBANK* AF009606 como referência. Além da sequência do HCV incluiu-se nas extremidades 5' e 3' desta sequência o sítio de restrição da enzima *Bam*HI, G▼GATCC e mais algumas bases aleatórias, resultando em uma sequência com 169 bases. A PCR em tempo real otimizada com o controle interno baseou-se na sequência de bases do HCV localizada nas mesmas posições. Na sequência sintética algumas bases da sequência original do HCV foram alteradas possibilitando o desenho da sonda que foi usada para distinguir o controle interno do vírus da hepatite C, quando colocados na PCR em tempo real multiplex. A síntese desta sequência foi feita por uma empresa especializada, a "GenScript". A sequência sintetizada foi inserida no vetor pUC57 e sequenciada no momento do seu preparo pela "GenScript".

A Figura 12 A - mostra a sequência de bases do HCV, posição 130 a 273. As bases em azul e em rosa correspondem aos "primers" estudados na PCR em tempo real para o controle interno e para o HCV. As bases em verde são a sequência de bases da sonda para o HCV. A Figura 12 B - mostra os nucleotídeos da sequência sintética. Os sítios *Bam*HI estão representados pelas bases em vermelho e as bases sublinhadas são as que foram alteradas em relação a sequência original e a sonda para o controle interno são as sequências em verde.

A- Sequência de nucleotídeos do HCV

CGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACC
 GGGTCCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGAC
 TGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCG

B -Sequência sintética

TCATGGGATCCGGGAGAGCCATAGTGGTCCGTGGACTGACACCGGAGACTGGGAATTGCC
 AGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCC
 CCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAGTGTGGGTCGCGGATCCTGGCAACCTC

FIGURA 12 - A: SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO 5' UTR DO HCV (POSIÇÃO 130 -273)
 B: SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA SEQUÊNCIA SINTÉTICA

NOTA: A: As bases em azul são as sequências dos "primers" HCV-F e HCV-R3 e em rosa a sequência do HCV-R2. As bases em verde correspondem a sonda do HCV. B: As bases em azul e rosa são os mesmos "primers" apresentados em A. A sonda para o CIC corresponde aos nucleotídeos em verde. As bases em vermelho representam os sítios de restrição da enzima *Bam*HI. A base em azul inserida no quadrado faz parte do sítio da *Bam*HI e do primer. As sublinhadas são as que diferem da sequência original.

3.12.2 Transformação pUC57 - SS (pUC57 - Sequência Sintética)

O vetor pUC57 - SS liofilizado, com 2.700 pares de bases mais as bases do gene sintético, foi resuspenso em tampão TE, sendo então transformado usando a célula competente DH5 α . O plaqueamento foi feito em placas LB/ampicilina, uma vez que este vetor têm o gene de resistência para este antibiótico. A técnica utilizada está descrita no Item 3.10.3. Foram plaqueados 20 e 50 μ l. As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas. Em seguida 1 clone proveniente destas placas foi colocado em 100 ml de meio LB/ampicilina e foi incubado a 37°C por 18 horas com agitação.

3.12.3 Obtenção de Plasmídeos pUC57 - SS

Um clone proveniente das placas da transformação foi colocado em 100 ml de meio LB/ampicilina. O meio foi incubado a 37°C por 18 horas, com agitação. A partir da cultura resultante foi feita a obtenção dos plasmídeos utilizando o Kit "HiSpeed Plasmid Midi", cujo princípio é o mesmo descrito no Item 3.11.7, com a

diferença de que o DNA eluído é submetido a purificação utilizando isopropanol e etanol a 70%, e é eluído em 500 ul de tampão TE. A leitura da concentração dos plasmídeos foi realizada no equipamento NanoDrop ND-1000.

3.12.4 Digestão do pUC57 - SS com *Bam*HI

Antes da digestão com a enzima de restrição *Bam*HI, com o objetivo de garantir maior eficiência no momento da ligação da sequência sintética ao gene do MS2, o plasmídeo pUC57 - SS foi purificado através de precipitação a frio com acetato de sódio 3 M pH 5,3 e álcool. Foram colocados em 250 ul de solução pUC57 - SS contendo 1,73 µg, 25 ul de acetato de sódio 3 M (10% do volume da solução), e 500 ul de etanol absoluto (dois volumes). A mistura foi mantida a -20°C, durante 18 horas. Após este período o vetor foi precipitado através de centrifugação a 4°C, 14.000 RPM, 20 minutos. Em seguida o sedimento do pUC57 obtido, foi colocado em 1 ml de etanol a 70% gelado e centrifugado a 4°C, 14.000 RPM, 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e após secagem do precipitado do pUC57 - SS, na bancada à temperatura ambiente, o mesmo foi resuspenso em 30 ul de água. A quantidade de vetor foi obtida através de leitura em NanoDrop ND-1000.

A digestão do pUC57-SS com *Bam*HI foi feita com o objetivo de separar a sequência sintética do vetor. O protocolo empregado utilizou 24 ul das soluções pUC57 - SS com 0,0337 ug/ul, 4 ul de tampão NEBuffer *Bam*HI 10X, 0,4 ul de BSA, 2 ul da enzima *Bam*HI com 20.000 U/ml e 9,6 ul de água ultrapura, totalizando um volume final de 40 ul. A reação foi incubada a 37°C overnight. Para visualização dos produtos da digestão, 1 ul do material digerido adicionado de 1 ul de tampão de carregamento - Ficoll 10X e 8 ul de água foi dispensado em um pocinho do gel de agarose 1,2%. A eletroforese foi feita a 100V, usando tampão Tris borato (TBE) 1% e utilizando o marcador 1 Kb Plus DNA Ladder. As bandas esperadas puderam ser visualizadas por coloração com brometo de etídeo.

Depois de confirmada a presença das bandas esperadas, aplicou-se os 39ul restantes da digestão do pUC57 - SS com *Bam*HI em gel de agarose 1,2%, utilizando 4 ul do tampão de carregamento, Ficoll 10X. O 1Kb Plus DNA Ladder, foi usado como marcador. A eletroforese foi feita da mesma forma que a anterior e após coloração com brometo de etídeo e com auxílio de luz ultra-violeta, o fragmento com

169 bases foi cortado e eluído do gel usando o “High Pure PCR Purification Kit”. Foram aplicadas as instruções do fabricante.

3.12.5 Digestão do Plasmídeo pET-47b(+) - MS2 com *Bam*HI

Esta digestão foi feita com o objetivo de gerar terminações no genoma do MS2 que permitissem a ligação da sequência sintética, também preparada com sítios *Bam*HI. 38 ul do plasmídeo pET-47b(+) - MS2 obtido após transformação na bactéria BL21, com concentração 105 ng/ul, foi colocado em 5 ul de tampão NEBuffer *Bam*HI, 0,5 ul de BSA 100X, 2 ul da enzima *Bam*HI com 20 U/ul, 4,5 ul de água, totalizando um volume final de 50 ul. O resultado da digestão foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%, usando 5 ul do produto da digestão. A enzima *Bam*HI, foi inativada pelo calor, colocando-se a mistura obtida a 65°C, durante 20 minutos. Após a inativação foi adicionado 5,5 ul do tampão 10X para a enzima SAP e 3,5 ul desta enzima da Amershan, totalizando um volume final de 55 ul. A mistura foi incubada a 37°C, 30 minutos, sendo em seguida purificada usando o Kit "High Pure PCR Purification". O material resultante foi eluído em 50 ul e foi analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.12.6 Ligação pET -47b(+) - MS2 - Sequência Sintética (pET-47b(+) - MS2 - SS)

A sequência sintética com sítios *Bam*HI, gerada no Item 3.12.4 foi inserida no gene da RNA replicase do genoma do bacteriófago MS2 presente no vetor pET-47b(+), previamente submetido à digestão com a mesma enzima. No protocolo foi colocado 1 ul de tampão da enzima T4 DNA ligase, 3 ul do vetor pET-47b(+), com concentração 33,7 ng/ul, 1 ul da sequência sintética com concentração 9,9 ng/ul, 1 ul da enzima T4 DNA ligase com 3 Weiss units/ul, e 4 ul de água, totalizando um volume final de 10 ul. A reação foi incubada a 15°C, por 18 horas.

3.12.7 Transformação pET-47b(+) - MS2 - SS

A construção pET-47b(+) - MS2 - SS foi transformada usando a célula competente DH5 α , e o protocolo descrito no Item 3.10.3. Foram plaqueados 100 μ l, 200 μ l e o concentrado obtido da centrifugação das bactérias em LB/canamicina. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C. Duzentos clones foram selecionados e transferidos para placas novas numeradas de LB/canamicina. Em cada placa foram colocadas 50 colônias.

3.12.8 PCR para Triagem dos Clones com o Plasmídeo pET-47b(+) - MS2 - SS

A seleção dos clones com o plasmídeo pET-47b(+) - MS2 - SS foi feita através de PCR, usando os "primers" MS2-F4 e MS2-R2, específicos para o bacteriófago MS2 e que estão descritos na Tabela 1. O tamanho do fragmento esperado na reação de PCR com estes "primers" feita para o MS2 é 573 bases, enquanto que o tamanho para o MS2 com a sequência sintética é 717 bases (573 bases do MS2 + 144 bases da sequência sintética). O protocolo de PCR usado incluiu: 5 μ l de MS2-F4 10 pmol/ μ l, 5 μ l de MS2-R2 10 pmol/ μ l, 5 μ l tampão 10X Promega, 4 μ l de MgCl₂ 50 mM, dNTP(s) 2,5 mM, 0,5 μ l de enzima Taq DNA polimerase 5 U/ μ l, 26,5 μ l de água ultra pura, uma pequena quantidade do clone bacteriano. A mistura foi colocada no termociclador, que foi programado com as seguintes condições térmicas: 94°C 5 minutos e 35 ciclos de 94°C, 30 segundos, 56°C, 30 segundos e 72°C por 2 minutos, e no final extensão a 72°C durante 10 minutos. O material amplificado foi submetido a eletroforese em agarose gel 1,2%, usando como controle 1 Kb Plus DNA Ladder, e o amplicon do MS2 de uma reação de PCR feita para o bacteriófago MS2 anteriormente.

3.12.9 PCR para Verificar a Orientação da Inserção da Sequência Sintética

Vinte e quatro clones que na PCR anterior produziram fragmentos com 717 bases foram submetidos a uma segunda PCR, com o objetivo de se verificar se a sequência sintética foi inserida no MS2 no sentido correto (5' - 3'). Como "primer" F foi usado o HCV-F, específico para o vírus da hepatite C, em combinação com o "primer" MS2-R2. Esta reação que gera um fragmento com 366 bases, além de indicar a posição da inserção, comprova também a presença da sequência sintética, uma vez que esta contém a sequência de bases deste "primer". Na reação foram colocados: uma pequena quantidade do clone, 2 ul do "primer" HCV-F 10 pmol/ul, 2 ul de MS2-R2 10 pmol/ul, 5 ul de tampão Promega 10X, 2 ul de MgCl₂ 50 mM, 4 ul de dNTP(s) 2,5 mM, 0,5 ul de Taq DNA polimerase 5 U/ul, 34,5 ul de água ultra pura, totalizando um volume final de 50 ul. A reação foi colocada no termociclador e a amplificação foi feita empregando os seguintes parâmetros cíclicos: 94°C, 5 minutos e 35 ciclos de 94°C, 30 segundos, 56°C, 30 segundos e 72°C por 30 segundos, seguido de extensão a 72°C durante 10 minutos. 5 ul do produto da amplificação foi colocado em agarose gel a 1,2%, juntamente com tampão de carregamento, A eletroforese foi feita conforme descrito no Item 3.11.8.

3.12.10 Sequenciamento do pET-47b(+) - MS2 - SS

Preparou-se 60 ul de solução 100 ng/ul do plasmídeo pET-47b(+) - MS2-SS. Esta solução foi enviada para sequenciamento na empresa MacroGen, Korea com os "primers" MS2-F1, MS2-R1, MS2-F2, MS2-R2, MS2-F3, MS2-R3, MS2-F4, MS2-R4 e o T7 promoter, todos com concentração 5 picomol/ul.

3.12.11 Obtenção de Plasmídeos pET-47b(+) - MS2 - SS

Seis clones que apresentaram os fragmentos esperados nas reações de PCR foram repicados para 5 ml de meio LB/canamicina. Os meios foram incubados a 37°C, por 18 horas. A partir destas culturas foi obtido o plasmídeo pET-47b(+)-

MS2 - SS, usando o “Kit QIAprep Spin MiniprepKit”, já descrito no Item 3.11.7. O protocolo foi feito de acordo com as instruções do fabricante.

3.12.12 Transformação do pET-47b(+) - MS2 - SS em BL21(DE3)pLysS

O plasmídeo obtido no Item anterior foi transformado na célula competente, BL21(DE3)pLysS, usando o mesmo protocolo descrito no Item 3.10.3. Foram plaqueados 10 ul, 20 ul, e 50 ul das células competentes transformadas, em placas de LB/canamicina.

3.13 EXPRESSÃO DOS BACTERIÓFAGOS

3.13.1 Expressão dos Bacteriófagos em Pequena Escala

Um clone de BL21(DE3)pLysS contendo o vetor pET-47b(+) - MS2 foi inoculado em 10 ml de meio LB/canamicina/cloranfenicol. A cultura foi incubada a 37°C, por 18 horas, com agitação. Usando a cultura obtida, preparou-se 2 tubos com 10 ml de uma diluição 1:100 e 1 tubo com 10 ml de uma diluição 1:10, usando o mesmo meio de cultura. Os três tubos foram incubados a 37°C. Um tubo com a diluição 1:100, foi usado como controle do experimento. No outro adicionou-se IPTG 3 horas após a incubação e no tubo com diluição 1:10, o IPTG foi colocado uma hora após a incubação. No tubo controle não foi colocado IPTG. Após a adição do IPTG, as culturas foram mantidas a 37°C, com agitação, durante 4 horas. Os lisados obtidos foram filtrados com filtros de 0,22 micras para remover debris celulares gerados pela lise bacteriana causada pela expressão e montagem das partículas do bacteriófago MS2 no meio. No tubo controle observou-se crescimento bacteriano acentuado e ausência de lise das células.

O mesmo protocolo foi usado para testar a expressão do bacteriófago recombinante (CIC - controle interno competitivo), a partir do plasmídeo pET-47b(+) - MS2 - SS.

Em um segundo momento testou-se como seria a expressão do MS2 adicionando-se o IPTG em diferentes tempos de incubação do inóculo. Preparou-se novamente um inóculo de BL21(DE3)pLysS contendo o vetor pET-47b(+) - MS2, em 10 ml de meio LB/canamicina/ cloranfenicol. Este inóculo foi diluído 1:100 (100 μ l do inóculo foi adicionado a 10 ml de meio LB). Esta diluição foi escolhida baseando-se nos resultados obtidos na testagem descrita anteriormente. Foram preparados 3 frascos Erlenmeyer 1, 2 e 3 respectivamente. Estes frascos foram incubados a 37°C, com agitação. No frasco nº 1, foi adicionado IPTG 1 mM, uma hora após a incubação. No frasco nº 2, 2 horas após e no nº 3, 3 horas após a incubação. Antes da adição do IPTG, foi retirada 1 alíquota de cada uma das culturas, cuja densidade óptica (DO) foi lida em espectrofotômetro a 600 nm e 2 horas após a adição do IPTG também foram coletadas alíquotas para a leitura da DO.

3.13.2 Expressão do Bacteriófago MS2 em Escala Maior

Para fazer a expressão em larga escala optou-se pela adição do IPTG 2 horas após a incubação. O mesmo protocolo foi usado para a expressão do MS2 e do controle interno competitivo. No momento da expressão do MS2 preparou-se um pré-inóculo, usando o clone de BL21(DE3)pLysS, contendo o vetor pET-47b(+) - MS2 em 7 ml de meio LB/canamicina/cloranfenicol. A cultura obtida foi incubada a 37°C, por 18 horas.

Este pré inóculo foi diluído 1:100, ou seja 2,5 ml da cultura de bactérias foi adicionado a 500 ml de meio LB/canamicina/cloranfenicol, acondicionado em frasco Erlenmeyer de 3 l. O meio inoculado foi mantido a 37°C, com agitação. Foram retiradas alíquotas 1, 2 e 3 horas após a incubação, para leitura da densidade óptica. Na terceira hora de incubação foi feita a adição de 500 μ l de IPTG, usando solução estoque 1 M. O meio foi novamente incubado a 37°C, com agitação. Foram retiradas alíquotas 1, 2, 3, e 4 horas após adição do IPTG. Na quarta hora a incubação a 37°C foi interrompida e os bacteriófagos foram obtidos e purificados.

3.13.3 Expressão do CIC em Escala Maior

Preparou-se o inóculo da BL21(DE3)pLysS, contendo o vetor pET-47b(+) - MS2 - SS e utilizou-se exatamente o mesmo protocolo descrito no Item 3.13.2.

3.14 RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS BACTERIÓFAGOS

Partículas de bacteriófagos podem ser obtidas em grande número a partir do meio extracelular de uma cultura bacteriana infectada. Quando uma destas culturas é centrifugada, os restos de células lisadas, juntamente com quaisquer células que permaneceram intactas, são sedimentadas deixando as partículas de fago em suspensão.

As partículas de fagos são tão pequenas que só podem ser sedimentadas por centrifugação a velocidades muito elevadas. Por isso a coleta dos fagos é geralmente feita por precipitação com polietilenoglicol (PEG). O PEG é um composto polimérico de cadeia longa que, na presença de sal, absorve água e, por isso, faz com que estruturas macromoleculares, como as partículas de fago precipitem. O material precipitado pode então ser dissolvido em um volume pequeno. O mesmo procedimento foi feito para o MS2 e para o CIC.

Os 500 ml de lisado obtidos na expressão foram distribuídos em frascos apropriados para a centrífuga Sorvall RC 5B Plus e foram centrifugados a 16.000 g, durante 10 minutos a 4°C.

O sobrenadante obtido foi colocado em Becker de 1 litro e esperou-se atingir a temperatura ambiente. Para digerir ácidos nucleicos liberados das bactérias lisadas, evitando que os bacteriófagos ficassem presos na solução viscosa proveniente destes materiais, foi adicionado 50 ul DNase pancreática 10 mg/ml e 50 ul de RNase 10 mg/ml e incubou-se a mistura em câmara fria por 18 horas. Em seguida para promover uma eficiente precipitação das partículas de bacteriófagos com o PEG, foi adicionado ao conteúdo, 29,25 g de NaCl, obtendo-se uma concentração final igual a 1 M. A mistura foi mantida no gelo durante 1 hora, sendo então centrifugada a 11.000 g, durante 10 minutos a 4°C, para remover os debris

celulares. O sobrenadante obtido foi colocado em Bécker, onde foi adicionado de forma lenta 45 g de polietilenoglicol (10% P/V). A adição foi feita com agitação, até completa dissolução. O material resultante foi colocado em câmara fria, por 18 horas, para permitir a precipitação dos bacteriófagos, que foram recuperados em seguida por centrifugação a 11.000 g, durante 10 minutos a 4°C. O sedimento obtido (bacteriófagos e outras impurezas) foi resuspenso em 11 ml de tampão SM estéril. SM é um tampão próprio para bacteriófagos.

Para purificar as partículas de fago presentes na solução obtida submeteu-se a mesma a centrifugação a 30.000 g, na ultra-centrífuga Himac SCP 85H2, rotor SW 40, durante 2 horas a 4°C.

Em seguida, descartou-se o sobrenadante, e resuspendeu-se as partículas do CIC em 3 ml do meio SM e do MS2 em 7 ml de meio SM, mantendo-se as suspensões em geladeira a 4°C.

3.15 TITULAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE BACTERIÓFAGOS

Após a expressão o MS2 e o controle interno competitivo foram titulados usando a técnica de cultura em dupla camada.

Esta técnica baseia-se na lise celular, que é o estágio do ciclo infectivo de todos os fagos líticos. Na técnica realizada a bactéria XL1-Blue F+ foi infectada individualmente com o bacteriófago que estava sendo titulado. Em seguida adicionou-se à essas células infectadas meio ágar soft e o conteúdo resultante foi imediatamente espalhado em um meio de ágar sólido. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C.

Após este período a lise celular pode ser visualizada na forma de placas denominadas PFU (Plaques Forming Unit) sobre um tapete de bactérias na superfície do ágar. Cada placa é uma zona de clareamento, produzida à medida que os fagos lisam as células, infectam bactérias vizinhas que acabam sendo lisadas e assim por diante. Cada placa de fago é derivada de uma célula individual infectada, que contém, portanto partículas virais idênticas. Estas placas são contadas obtendo-se assim o título de bacteriófagos presentes na suspensão inicial.

3.15.1 Preparo do Inóculo da Bactéria XL1-Blue

A bactéria XL1-Blue é uma célula competente F⁺, ou seja, possui o plasmídeo F que confere a célula a propriedade de conjugação bacteriana. O plasmídeo F carrega os "loci" *tra* e *trb*, que juntos têm 33 Kb de comprimento e consistem de aproximadamente 40 genes. O "locus" *tra* inclui o gene *pillin* e genes regulatórios, que juntos formam uma estrutura túbulo símile denominada pilo sexual na superfície celular. O pilo é composto por proteínas poliméricas que podem ligar-se à superfície celular de uma bactéria F e iniciar a conjugação. O mecanismo exato deste evento é ainda muito discutido, porém acredita-se que a função do pilo é fazer o contato entre as células e que após isto, várias proteínas codificadas pelos loci *tra* e *trb* abrem um canal entre as bactérias. Através do pilo sexual ocorre a transferência de uma das fitas do plasmídeo F presente em uma bactéria F⁺ para uma bactéria F⁻.

E é também através do pilo que ocorre a injeção da molécula de ácido nucleico do bacteriófago MS2 nas células bacterianas. Desta forma na titulação dos fagos é essencial a utilização de uma célula bacteriana F⁺ e por isso a XL1-Blue F⁺, foi escolhida para ser usada na titulação dos bacteriófagos expressos.

No procedimento experimental inoculou-se um clone da bactéria XL1-Blue F⁺ em 3 ml de meio LB/tetraciclina. Incubou-se a cultura por 18 horas, a 37°C com agitação. Preparou-se uma diluição 1:10 deste inóculo, usando o mesmo meio de cultura. A diluição preparada foi incubada a 37°C, com agitação, durante 3 horas, até a cultura atingir fase ótima de crescimento. Neste momento, para precipitar as bactérias, centrifugou-se a cultura a 10.000 RPM, durante 5 minutos a 4°C. O sedimento bacteriano resultante foi resuspenso em 10 ml de meio SM, ao qual adicionou-se 50 µl de solução de CaCl₂ 1 Molar, obtendo-se uma concentração final igual a 5 mM. Manteve-se as bactérias a 4°C.

3.15.2 Preparo da Suspensão de XL-1BLUE e Bacteriófagos

As partículas de bacteriófagos MS2 expressas a partir do plasmídeo pET-47b(+) - MS2 ou de bacteriófagos recombinantes (CIC) expressas usando o pET-47b(+) - MS2 - SS no momento da titulação foram diluídas sequencialmente 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000, usando 900 ul de meio LB e 100 ul da solução de MS2 ou de CIC obtidas após a purificação conforme descrito nos Item 3.14.

Colocou-se 20 ul da suspensão de bacteriófago que estava sendo titulada em tubo estéreis, numerados contendo 100 ul das bactérias preparadas no Item 3.15.1. Foram preparados triplicatas dos tubos nomeados A, B, C e D, contendo respectivamente as diluições de bacteriófagos 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10.000. Preparou-se tubos controle contendo somente a bactéria XL1-Blue. Todos os tubos foram incubados a 37°C, durante 30 minutos.

Após o período de incubação colocou-se individualmente sobre cada suspensão obtida 4 ml do meio ágar-soft. Este meio foi previamente preparado e esterilizado. No momento do uso foi dissolvido em microondas e alíquotado em tubos estéreis com tampa de rosca. Esta alíquotagem foi feita rapidamente e os tubos foram mantidos em banho-maria a 42°C, até o momento da dispensação sobre a suspensão de XL1-Blue mais bacteriófagos.

Rapidamente, após o preparo cada suspensão bactéria-bacteriófago-ágar-soft foi vertida em uma placa LB/tetraciclina. Estas placas foram preparadas adicionando-se e distribuindo-se na superfície do meio LB sólido 25 ul do antibiótico tetraciclina 25 mg/ml. Após a secagem as placas foram mantidas a 37°C até o momento do uso.

As placas contendo a XL1-BLUE e os bacteriófagos foram incubados a 37°C por 18 horas, após o que foi feita a contagem das PFU/ml. O número de "plaques" contados em 20 ul, que foi o volume da solução de bacteriófagos usado no preparo da solução foi multiplicado pelo fator 1000 para se obter a unidade PFU/ml e foi multiplicado também pelo fator de diluição usado no momento do preparo da placa, obtendo-se assim a titulação do fago.

3.16 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

Os RNA(s) dos controles internos, das amostras de pacientes e do painel de HCV foram isolados usando dois produtos comerciais, o QIAamp®Viral RNA Kit e o QIAamp®MinElute Virus Kit, ambos da Qiagen.

Com o QIAamp®Viral RNA Kit, a extração foi feita a partir de 140 ul de cada uma das amostras, que foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente com 560 ul de tampão de lise contendo sais caotrópicos e carreador de RNA. Esta fase ocorre em condições altamente denaturantes para inativar RNases e assegurar o isolamento de RNA viral intacto. Depois da adição de 560 ul de etanol a 100%, livre de RNase, o RNA precipitado foi colocado em colunas à base de sílica para a purificação e foi eluído em 60 ul do tampão de eluição QIAamp.

Com o QIAamp®MinElute Virus Kit, a extração foi feita a partir de 200 ul de amostra. Da mesma forma, as amostras foram lisadas na presença de carreador de RNA sob condições altamente denaturantes, elevadas temperaturas e com protease com o objetivo de assegurar a inativação de RNases. Após a adição de 250 ul de etanol a 100%, livre de RNase, os lisados foram transferidos para as colunas QIAamp MinElute, sendo então o RNA adsorvido às membranas de sílica gel. Condições de pH e sais garantem que proteínas e outros contaminantes que possam inibir a PCR não sejam retidos pela coluna. Após a purificação, o RNA foi eluído em 60 ul de tampão do kit.

Todos os RNA(s) obtidos foram estocados a -70°C até o momento do seu uso.

Além das extrações individuais foram obtidos RNA(s) a partir de amostras de HCV combinadas com o controle interno competitivo e com o controle MS2. Preparou-se diluições seriadas na ordem 10 (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} e 10^{-11}), destes controles em estudo e adicionou-se 5 ul de cada uma destas diluições em 195 ul de amostras de HCV. O RNA foi extraído destas combinações a partir dos 200 ul obtidos, usando o Kit QIAamp®MinElute Virus Kit.

3.17 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS PARA PCR EM TEMPO REAL

Desenhou-se oligonucleotídeos para a amplificação do CI MS2, do MS2 recombinante (controle interno competitivo), e para o HCV.

Os "primers" e as sondas foram selecionados usando o software "Primer Express" (Applied Biosystems). Os "primers" utilizados apresentavam T_m entre 58 e 60°C e a sonda T_m de 7 a 10°C superior a dos iniciadores. As sondas não apresentavam guanina na extremidade 5' e o tamanho do fragmento amplificado não ultrapassava 200 pb. Também optou-se por sequências com baixa probabilidade de formação de estruturas secundárias e de dimerização. A sonda para detecção do HCV foi feita com FAM na extremidade 5' e BHQ na extremidade 3'. As sondas para os demais ensaios foram preparadas com VIC na extremidade 5' e MGBNFQ na extremidade 3'.

Para o controle interno MS2 utilizou-se como referência a sequência do bacteriófago MS2, ref. NC_001417.1, disponível no "GenBank" já usada para desenhar os "primers" que foram usados na PCR tradicional. A localização destes oligonucleotídeos esta mostrada em uma versão esquemática na Figura 22 no Item 4.4 que apresenta todos os oligonucleotídeos desenhados baseando-se nesta sequência.

Os "primers" e a sonda específica para o HCV estão localizados na região 5' UTR do genoma viral e foram feitos para amplificar todos os genótipos do vírus da hepatite C. Estes oligonucleotídeos foram desenhados em um projeto anterior desenvolvido no Instituto Carlos Chagas (DUARTE *et al.*, 2006). A sequência destes "primers" foram localizadas em uma sequência consensus que resultou do alinhamento de sequências da região 5' UTR do HCV, obtidas no GenBank. Nesta análise foi verificada a necessidade da inclusão de uma degeneração no iniciador reverso, com o objetivo de amplificar o genótipo 2 do vírus da hepatite C. Esta análise foi feita porque o HCV por ser um vírus RNA é altamente suscetível a mutações, fazendo-se necessária uma constante vigilância de novas sequências depositadas em bancos de dados, garantindo assim a performance das técnicas diagnósticas. Testou-se também o "primer" reverso HCV-R2, cuja sequência também está descrita na Tabela 2.

Na amplificação do controle interno competitivo, utilizou-se os mesmos "primers" desenhados para o HCV, uma vez que suas sequências estão presentes na sequência sintética inserida no genoma do MS2 e mostrada no Item 3.12.1. A sonda para o controle interno competitivo foi desenhada baseando-se também nesta sequência que é derivada do HCV, porém algumas bases nesta sequência foram

modificadas possibilitando o desenho da sonda que foi usada para distinguir a amplificação do controle interno competitivo da do HCV na PCR multiplex.

A Tabela 2 mostra a sequência de todos os "primers" e sondas desenhados para a PCR em tempo real usados neste trabalho.

TABELA 2 - "PRIMERS" E SONDAS USADOS NO ENSAIO DE PCR EM TEMPO REAL

Oligonucleotídeo	Alvo	Seqüência 5'-3'	Região Genômica	Produto Amplificado
MS2-F5	CI MS2	TCCTAAAAGATGGAAACCCGATT	1.669 - 1.691	
MS2-R5	CI MS2	GGCCGGCGTCTATTAGTAGATG	1.718 - 1.739	71 bp
MS2-S5 sonda	CI MS2	CCTCAGCAATCGCAGCAAACCTCCG	1.693 - 1.716	
HCV-F ^a	HCV e CIC	CGGGAGAGCCATAGTGGT	130 - 147	
HCV-R2	HCV e CIC	CCAAGAAAGGACCCGGTC	184 - 201	72 bp
HCV-R3	HCV e CIC	CGCRACCCAACRCTACTC	256 - 273	144 bp
HCV-S ^a	HCV	TGCGGAACCGGTGAGTACACC	149 - 169	
HCV-SCI sonda	CIC	CGTGGACTGACACGCGAGACT	30 - 50	
HCV-SCI3 sonda	CIC	ACTGACACGCGAGA	35 - 48	

NOTA: ^aoligonucleotídeos descritos por Duarte *et al.* (2006).

3.18 TRANSCRIÇÃO REVERSA: OBTENÇÃO DE cDNA PARA A PCR EM TEMPO REAL "TWO STEP"

Na síntese do cDNA do controle interno competitivo, do CI MS2, do HCV e das combinações multiplex HCV e cada um dos controles internos utilizou-se a transcriptase reversa ImProm-II™, e um protocolo feito em duas fases. Na primeira fase colocou-se 8,6 ul de RNA e 1 ul do "primer" com concentração 5 pmol/ul. A reação obtida foi incubada a 70°C, durante 10 minutos. Na Tabela 3 estão descritos os "primers" usados para a síntese da fita de cDNA.

TABELA 3 - "PRIMERS" R USADOS NA TRANSCRIÇÃO REVERSA DOS CONTROLES INTERNOS E DO HCV

Transcrição reversa	"Primers" conc.5 pmol/ul
CIC	HCV-R3
MS2	MS2-R5
HCV	HCV-R3
CIC + HCV	HCV-R3
MS2 + HCV	MS-R5 e HCV-R3

Nesta tabela pode-se observar que transcrição reversa multiplex para RNA(s) obtidos de amostras de HCV adicionadas de CIC, foi feita usando apenas um "primer" R e a reação para RNA(s) obtidos de amostras de HCV adicionadas de MS2 foi feita com 7,6 ul de RNA e com dois "primers" R, um específico para o MS2 e outro para o HCV, não havendo modificação no volume de reação.

Na fase 2 adicionou-se, à primeira fase, 10,4 ul da mistura de reação constituída por 4 ul do tampão ImProm II 5X, 2,4 ul de MgCl₂ 25 mM, 1,0 ul de dNTP(s) 10 mM, 1 ul de RNase OUT™ com 40 U/ul e 2 ul de transcriptase reversa ImProm-II™. A reação com um volume final de 20 ul foi mantida a 42°C, durante 2 horas.

Ao término da mesma completou-se o volume para 500 ul com água, e o produto final da transcrição foi purificado usando a coluna de concentração Microcon 30 (Amicon), com o objetivo de remover "primers" não incorporados e outros componentes indesejáveis que pudessem inibir a reação de PCR. Utilizou-se o protocolo recomendado pelo fabricante e ajustou-se o volume do cDNA obtido para 100 ul. Preparou-se alíquotas de 17 ul de cDNA, que foram mantidas a -20°C, até o momento da amplificação na PCR em tempo real.

3.19 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL "TWO STEP" PARA O CONTROLE INTERNO COMPETITIVO, PARA O MS2 E PARA O HCV

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado no equipamento 7.500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Utilizou-se o Kit TaqMan Universal Master Mix® (Applied Biosystems), que permite colocar-se em uma mesma reação sondas específicas para diferentes alvos, sendo possível desta forma o desenvolvimento de reações multiplex, e o kit SYBR Green® Master Mix (Applied Biosystems), para avaliar a performance e especificidade dos pares de "primers" desenhados.

Testou-se protocolos de reações individuais para o CIC, MS2 e para as amostras de HCV, usando amostras de cDNA obtidas para cada um destes controles conforme descrito no Item 3.18. Os resultados foram cuidadosamente estudados, procurando-se identificar um protocolo único que pudesse ser usado na amplificação de todos os controles.

Com o Kit TaqMan o protocolo base para os três controles foi feito usando 5 ul de cDNA, 10 ul do tampão TaqMan® Universal Master Mix, 1 ul de "primer" F e 1 ul do R, ambos com concentração 5 pmol/ul, 2 ul de sonda TaqMan com concentração 1 pmol/ul e 1 ul de água ultra-pura, totalizando um volume final de 20 ul. Para cada controle amplificado utilizou-se "primers" e sondas específicos para o cDNA presente na reação. Esses "primers" e sondas bem como seus respectivos alvos estão indicados na Tabela 2, apresentada no Item 3.17, onde constam também detalhes relacionados a sequência e localização.

Todas as reações foram feitas em triplicata, usando placas próprias para PCR em tempo real. Os parâmetros cíclicos usados na amplificação foram: 95°C 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C, 30 segundos, 50°C, 30 segundos e 72°C durante 1 minuto.

Pequenas alterações no protocolo base serão comentadas na seção de resultados.

A reação com SYBR Green®, foi feita com 5 ul de cDNA obtido na transcrição reversa feita para cada controle, 10 ul do Sistema SYBR Green® Master Mix, 1 ul de "primer" F e 1 ul do R, ambos com concentração 5 pmol/ul, e 3 ul de água obtendo-se assim um volume final de 20 ul. Os "primers" foram os mesmos

usados na reação com TaqMan. As sondas não são utilizadas neste sistema. Na amplificação no equipamento 7.500 Real Time PCR System aplicou-se a mesma ciclagem usada para o Sistema TaqMan com a diferença de que no final foi incluída uma fase de análise de dissociação do produto de PCR. Esta análise de dissociação foi feita submetendo-se a reação aos seguintes parâmetros térmicos: 1 ciclo a 95°C, 15 segundos, 60°C, 1 minuto, 95°C e 60°C durante 15 segundos.

3.20 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX "TWO STEP"

Optimizou-se duas PCR em tempo real multiplex, uma para RNA(s) obtidos de amostras de HCV adicionadas do CIC e uma segunda para RNA(s) obtidos de amostras de HCV adicionadas do MS2. Estes RNA(s) foram transcritos para cDNA, de acordo com o Item 3.18.

A reação multiplex com o controle interno foi padronizada com 5 ul do produto da transcrição reversa multiplex feita para o RNA da extração HCV mais CIC, 11 ul do tampão TaqMan® Universal Master Mix, 1 ul dos "primers" HCV-F e HCV-R2, ambos com concentração 5 pmol/ul, 2 ul de sonda HCV-SCI3, com concentração 1 pmol/ul, específica para o CIC e 2 ul da sonda HCV-S, específica para o vírus da hepatite C, com concentração 5 pmol/ul, totalizando um volume final de 22 ul. Este protocolo foi feito usando as seguintes condições térmicas: 95°C 10 minutos, 45 ciclos de 95°C, 30 segundos e 60°C durante 1 minuto, condição esta diferente da usada nas reações individuais. Testou-se o mesmo protocolo com os "primers" HCV-R3 e a sonda HCV-SCI.

A reação multiplex com o MS2 foi padronizada com 5 ul do produto da transcrição reversa multiplex para o RNA da extração HCV mais MS2, 13 ul do tampão TaqMan® Universal Master Mix, 1 ul dos "primers" HCV-F, HCV-R2, MS2-F5 e MS2-R5, também com concentração 5 pmol/ul, 2 ul de sonda HCV-S com concentração 5 pmol/ul e 2 ul da sonda MS2-S5, com concentração 1 pmol/ul, totalizando um volume final de 26 ul. Utilizou-se os mesmos parâmetros térmicos descritos para a reação multiplex HCV/CIC. A Tabela 4 apresenta as combinações de "primers e sondas" usados na PCR multiplex

TABELA 4 - "PRIMERS" USADOS NA PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX

cDNA	Conjunto de "primers"	Sondas
HCV e CIC	HCV-F e HCV-R2	HCV-S e HCV-SCI3
	HCV-F e HCV-R3	HCV-S e HCV-SCI HCV-S e HCV-SCI3
HCV e MS2	HCV-F e HCV-R2 e MS2-F5 e MS2-R5	HCV-S e HCV-SCI HCV-S e MS2-S5

3.21 QUANTIFICAÇÃO DO CONTROLE INTERNO COMPETITIVO

O cDNA viral do CIC foi quantificado na técnica de PCR em tempo real "TWO STEP", usando como referência o cDNA do MS2, titulado conforme descrito no Item 3.15.

Foram feitas 3 réplicas biológicas da extração do RNA viral do CIC e 4 réplicas biológicas da extração do MS2, usando 60 ul de suspensão dos fagos em 540 ul de meio SM. Utilizou-se na extração o produto comercial QIAamp® Viral RNA, de acordo com as instruções do fabricante. Os RNA(s) do CIC e do MS2 foram eluídos em 60 ul, transcritos com o "primer" reverso MS2-R5, usando 8,6 ul de RNA e a metodologia descrita no Item 3.18. Obteve-se assim o cDNA do CIC e do MS2.

Após a transcrição todos os cDNA obtidos foram purificados com coluna de concentração Microcon 30 (Amicon), sendo seus volumes ajustados para 100 ul, aliquotados e congelados. Somente o cDNA da quarta extração do MS2 foi colocado em 25 ul e foi usado para a construção da curva padrão, preparando-se diluição seriada na ordem 10. Foram feitas oito diluições que geraram oito pontos na curva de quantificação. Amplificação foi realizada para triplicatas de 5 ul de cada uma das diluições da curva e para triplicatas de 5 ul de cDNA(s) não diluídos do CIC e do MS2. Preparou-se a mistura de reação para o sistema TaqMan conforme descrito no Item 3.19, utilizando como "primers" o MS2-F5 e o MS2-R5. O termociclador foi programado com as condições térmicas descritas no mesmo Item.

A quantificação foi feita baseando-se na curva padrão gerada com os dados da amplificação das diluições do padrão (MS2). Esta curva foi usada pelo software

da empresa Applied Biosystem 7.500, para inferir a concentração das amostras desconhecidas da mesma placa, amplificadas sob as mesmas condições. Os dados obtidos para estas amostras de MS2 e do CIC foram correlacionados.

3.22 IMPLEMENTAÇÃO DO USO DO CONTROLE INTERNO EM FORMATO 'TWO STEP'

A implementação do uso do controle interno, consistiu na definição da quantidade de controle a ser adicionada na amostra clínica, de modo a obter-se na PCR um sinal para o controle interno que possa ser visualizado e que não suprima ou interfira na amplificação da sequência do microorganismo alvo no teste diagnóstico, principalmente quando baixas concentrações deste microorganismo estão presentes.

3.22.1 Controle Interno Competitivo

Um primeiro teste realizado com o propósito de definir-se a concentração de CIC a ser colocado às amostras de HCV foi feito adicionando-se cDNA do CIC a de cDNA de amostras de HCV.

Primeiramente obteve-se RNA de 3 amostras de HCV com carga viral 682.000 UI/ml, 180.000 UI/ml e 1.270 UI/ml, usando 200 ul de amostra e o produto QIAamp®MinElute Vírus, conforme instruções do fabricante. Os RNA(s) obtidos foram transcritos com o "primer" HCV-R3 e de acordo com o Item 3.18.

Preparou-se 100 ul de diluição seriada na ordem 10 do cDNA do CIC com $0,100 \times 10^6$ PFU eq. Este cDNA foi obtido no momento do estudo da estabilidade descrita no Item 3.24. Adicionou-se respectivamente 10 ul da diluição 1×10^{-3} contendo 10 PFU eq. do CIC em 10 ul de cDNA do HCV com 2.346.06 UI, 619,20 UI e 4,36 UI. O mesmo procedimento foi feito com a diluição $1:10^{-6}$ do cDNA do CIC, com 0,01 PFU eq. e com o cDNA do CI não diluído com 10^4 PFU eq. Desta forma obteve-se 20 ul de cada uma das combinações. Triplicatas de 5 ul de cada uma destas combinações foram colocadas na reação de PCR em tempo real multiplex

otimizada para o HCV e para o controle interno descrita no Item 3.19. Amplificou-se também amostras individuais do cDNA do CIC não diluído e das diluições preparadas sem a adição do CIC e das amostras de HCV.

Em um segundo momento adicionou-se o CIC à amostra de hepatite C, antes do processo de extração. Esta amostra foi preparada colocando-se 100 ul de amostra de HCV com carga viral 682.000 UI/ml em 100 ul de amostra 180.000 UI/ml e completando-se o volume para 1000 ul com plasma humano negativo para doenças infecciosas (HbsAg, HIV, HTLV, Chagas, a-HBc, sífilis e HCV), obtendo-se uma amostra com 86.200 UI/ml. Preparou-se diluição seriada da suspensão do CIC na ordem 10. Foram feitas 11 diluições: de 10^{-1} até 10^{-11} . Em seguida preparou-se 6 tubos, com 195 ul de amostra de hepatite C em teste e colocou-se 5 ul da diluição 10^{-6} com $2,5 \times 10^{-2}$ PFU eq., 5 ul da diluição 10^{-7} , com $2,5 \times 10^{-3}$ PFU eq., 5 ul da diluição 10^{-8} com $2,5 \times 10^{-4}$ PFU eq., 5 ul da diluição 10^{-9} com $2,5 \times 10^{-5}$ PFU eq., 5 ul da diluição 10^{-10} com $2,5 \times 10^{-6}$ PFU eq., e 5 ul da diluição 10^{-11} com $2,5 \times 10^{-7}$ PFU eq.

Em outros 2 tubos, colocou-se 195 ul de plasma humano negativo e em cada um deles 5 ul das diluições 10^{-6} com $2,5 \times 10^{-2}$ PFU eq. e 10^{-8} com $2,5 \times 10^{-4}$ PFU eq.). Obteve-se então o RNA do vírus da hepatite C e do CIC a partir dos tubos preparados, usando o Kit QIAamp®MinElute Virus, seguindo instruções do fabricante. Os RNA(s) obtidos foram eluídos em 60 ul de tampão, transcritos usando 8,6 ul de RNA e o "primer" HCV-R3. Os cDNA (s) do CIC/plasma e CIC/HCV foram amplificados na técnica de PCR em tempo real descrita no Item 3.19 e 3.20 respectivamente.

Para estabelecer o limite de detecção da técnica de PCR em tempo real para o HCV com o CIC, estudou-se os resultados produzidos pela adição individual de 5 ul de CIC diluído 10^{-6} , com $2,5 \times 10^{-2}$ PFU eq. e 10^{-7} com $2,5 \times 10^{-3}$ PFU eq., em 195 ul de amostras de hepatite C. Estas amostras já haviam sido estudadas no momento da implementação, e o volume disponível não era suficiente para os ensaios projetados. Por isso adicionou-se 200 ul de plasma negativo nas amostras com carga viral 682.000 UI e 180.000 UI. e estas passaram a ter 545.600 UI/ml e 144.000 UI/ml. A amostra com carga viral 1.270 UI/ml, foi usada pura. A partir das amostras preparadas foram obtidos os RNA(s).

As extrações dos RNA(s) feitas com o QIAamp®MinElute Vírus Kit foram eluídas em 60 ul de tampão AVE, concentradas para 10 ul, utilizando coluna de concentração Microcon 30 (Amicon). Na transcrição reversa com o "primer" HCV-R3,

utilizou-se 8,6 ul de cada um dos RNA(s). O cDNA produzido, após purificação com coluna de concentração Microcon 30 (Amicon) foi colocado em 100 ul de água e aliqotado.

Os 100 ul de cDNA da amostra de HCV com 1.270 UI/ml foi separado em duas alíquotas, uma de 25 ul (A) que foi reservada para a PCR e a outra com 75 ul que foi concentrada para 20 ul (B) com coluna de concentração Microcon 30 (Amicon).

Todos os cDNA(s) obtidos foram amplificados na técnica de PCR em Tempo Real multiplex para o CIC e o HCV, otimizada no Item 3.20.

3.22.2 MS2

Para definir-se a quantidade de CI MS2 a ser adicionada a amostra de hepatite C utilizou-se o mesmo esquema de testagem aplicado para o CIC.

Preparou-se diluição seriada da suspensão do CI MS2 na ordem 10. Foram feitas 11 diluições: 10^{-1} até 10^{-11} . Em seguida preparou-se 6 tubos, colocando-se 195 ul das mesmas amostra de hepatite C usadas no teste do CIC e 5 ul da diluição 10^{-6} com 1×10^{-2} PFU, 5 ul da diluição 10^{-7} com 1×10^{-3} PFU, 5 ul da diluição 10^{-8} com 1×10^{-4} PFU, 5 ul da diluição 10^{-9} com 1×10^{-5} PFU, 5 ul da diluição 10^{-10} com 1×10^{-6} PFU e 5 ul da diluição 10^{-11} com 1×10^{-7} PFU. As mesmas diluições foram colocadas em 195 ul de plasma negativo para doenças infecciosas.

Usando esta preparações obteve-se simultaneamente os RNA(s) do HCV e do MS2 com o Kit QIAamp®MinElute Virus que foram eluídos em 60 ul, transcritos usando 7,6 ul de RNA e os "primers" MS2-R5 e HCV-R3, purificados com coluna de concentração Microcon 30 (Amicon), sendo o volume final ajustado para 100 ul. Os cDNA(s) obtidos foram colocados em triplicata na placa de PCR em tempo real. Preparou-se a reação para o multiplex MS2-HCV conforme descrito no Item 3.20.

Para estabelecer o limite de detecção da técnica de PCR em tempo real para o HCV com o CI MS2, preparou-se as combinações HCV/CIC colocando-se em 195 ul de cada uma das amostras de HCV, 5 ul de CIC diluído 10^{-5} contendo 1×10^{-1} PFU e 10^{-6} com 1×10^{-2} PFU, respectivamente. As preparações foram processadas da mesma forma descrita no limite de detecção para o CIC no Item 3.22.1. A

transcrição reversa do RNA do MS2 e do HCV foi feita como descrito no Item 3.18 e a PCR multiplex conforme o Item 3.20.

3.23 REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL MULTIPLEX "ONE STEP"

Neste ensaio utilizou-se o Kit TaqMan[®]One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit que permite que ocorra em uma mesma reação a transcrição reversa (RT) e a reação em cadeia por polimerase de um RNA específico, usando um sistema único de tampão e sem a adição de reagentes entre as duas fases, com a vantagem de que um único tubo é preparado para as duas reações. O produto contém a enzima AmpliTaqGold, dNTP(s), o Rox como referência passiva e tampão otimizado. coloca-se ainda no momento do preparo da reação uma transcriptase reversa recombinante derivada do Vírus da Leucemia Murina e um inibidor de RNase ((MultiScribe[™] Reverse Transcriptase and RNase Inhibitor). Como no TaqMan Universal Master Mix[®] é possível colocar-se em uma mesma reação sondas específicas para diferentes alvos permitindo o desenvolvimento de reações multiplex. A enzima transcriptase reversa e o inibidor de RNases podem ser adaptados ao kit SYBR Green[®] Master Mix, para avaliar a performance e especificidade dos "primers" usados nas reações.

Testou-se protocolos individuais para as combinações CIC/HCV e MS2/HCV, variando-se as concentrações dos "primers" e das sondas usadas na PCR. Utilizou-se os mesmos "primers" e sondas usadas na PCR em Tempo Real "TWO STEP" descritos na tabela 2.

Para as combinações CIC/HCV a reação foi padronizada utilizando-se 25 μ l de 2X master mix sem UNG (enzima Uracil- N-Glycosilase), 1,25 μ l de de 40X MultiScribe and RNase Inhibitor Mix, 1 μ l de uma solução que tinha em 50 μ l (500 pmol do "primer" HCV-F, 500 pmol da sonda HCV-S, 100 pmol da sonda HCV-SCI3 e 1000 pmol do "primer" HCV-R2). Adicionou-se também na reação 2,75 μ l de água RNase free e 20 μ l de RNA, extraído das preparações de 5 μ l do CIC diluído 10^{-6} e 195 μ l de amostra de HCV. As reações foram amplificadas no equipamento 7.500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) usando os parâmetros cíclicos: 48°C 30 minutos, 95°C 10 minutos seguido por 45 ciclos de 95°C 30 segundos e 60°C durante 1 minuto.

Para as combinações MS2/HCV padronizou-se a reação com 25 ul de 2X master mix sem UNG (enzima Uracil- N-Glycosilase), 1,25 ul de de 40X MultiScribe and RNase Inhibitor Mix, 1 ul de uma solução em que 25 ul continha (1000 pmol do "primer" HCV-R2, 1000 pmol do "primer" MS2-R5) e 1 ul de uma segunda solução com (500 pmol do "primer" HCV-F, 500 pmol da sonda HCV-S, 1000 pmol do "primer" MS2-F5 e 200 pmol da sonda MS2-S5 em 50 ul), 1,25 ul de água RNase free e 20 ul de RNA obtido das preparações constituídas por 5 ul do MS2 diluído 10^{-5} e 195 ul de amostra de HCV. Utilizou-se os mesmos parâmetros cíclicos descritos para as combinações CIC/HCV.

A reação com kit SYBR Green® Master Mix para as combinações CIC/HCV foi otimizada usando 12,5 ul do Sistema SYBR Green® Master Mix, 1 ul de solução 5 pmol/ul do "primer" HCV-F, 1 ul de solução 5 pmol/ul do "primer" HCV-R2, 0,625 ul de 40X MultiScribe and RNase Inhibitor Mix, 4,875 ul de água RNase free e 5 ul de RNA. Os parâmetros cíclicos usados na amplificação foram 48°C 30 minutos, 95°C 10 minutos, e em seguida foram feitos 45 ciclos de 95°C 30 segundos, 60°C 30 segundos e 72°C 1 minuto. Para a dissociação do produto amplificado a reação foi submetida a 95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto, 95°C 15 segundos e 60°C 15 segundos.

Para as combinações MS2/HCV a reação com SYBR Green® foi padronizada usando 12,5 ul do Sistema SYBR Green® Master Mix, 1 ul de solução 5 pmol/ul do "primer" HCV-F, 1 ul de solução 5 pmol/ul do "primer" HCV-R2, 1 ul de solução 5 pmol/ul do "primer" MS2-F5, 1 ul de solução 5 pmol/ul do "primer" MS2-R5, 0,625 ul de 40X MultiScribe and RNase Inhibitor Mix, 2,875 ul de água RNase free e 5 ul de RNA

3.24 TESTE DE ESTABILIDADE

O CIC construído e o MS2 foram mantidos em diferentes condições de estocagem com o objetivo de se definir aquela que melhor garantiria as características do mesmo. Manteve-se estes controles em geladeira com uma temperatura média de 4°C, durante 2 meses. Após este período preparou-se alíquotas que foram mantidas a temperatura ambiente (TA), 4°C e - 20°C, durante

um período de três meses. Neste momento obteve-se 3 réplicas de RNA de cada controle mantido em cada uma das condições. Cada réplica foi preparada separadamente, em dias diferentes.

Para a obtenção destas réplicas preparou-se uma diluição 1×10^{-1} da suspensão do controle e utilizou-se 140 μ l no QIAamp® Viral RNA. O RNA obtido foi eluído em 60 μ l.

Cada um destes RNA(s) foi transcrito usando 8,6 μ l do mesmo e o "primer" HCV-R3. A transcrição foi feita como descrito no Item 3.18 e a PCR em tempo real de acordo com o Item 3.19. O mesmo procedimento foi feito 8 meses após a estocagem das amostras.

4 RESULTADOS

4.1 CONTROLE INTERNO COMPETITIVO

Com o objetivo de construir um controle interno para validar uma reação de PCR em tempo real para detecção do vírus da hepatite C, utilizou-se como base o genoma do bacteriófago MS2 que é um vírus RNA como o HCV, para construir 3 plasmídeos pGEM[®]-T Easy - MS2, pET-47b(+) - MS2, pET-47b(+) - MS2 - SS.

O pET-47b(+) - MS2 e o pET-47b(+) - MS2 - SS foram usados para expressar respectivamente o CI MS2 e o CI MS2 recombinante que são os controles internos que foram testados na técnica diagnóstica para o HCV. No pET-47b(+) - MS2 - SS o genoma do bacteriófago foi geneticamente modificado e no momento da expressão produziu-se partículas não replicativas que foram usadas como padrão biológico.

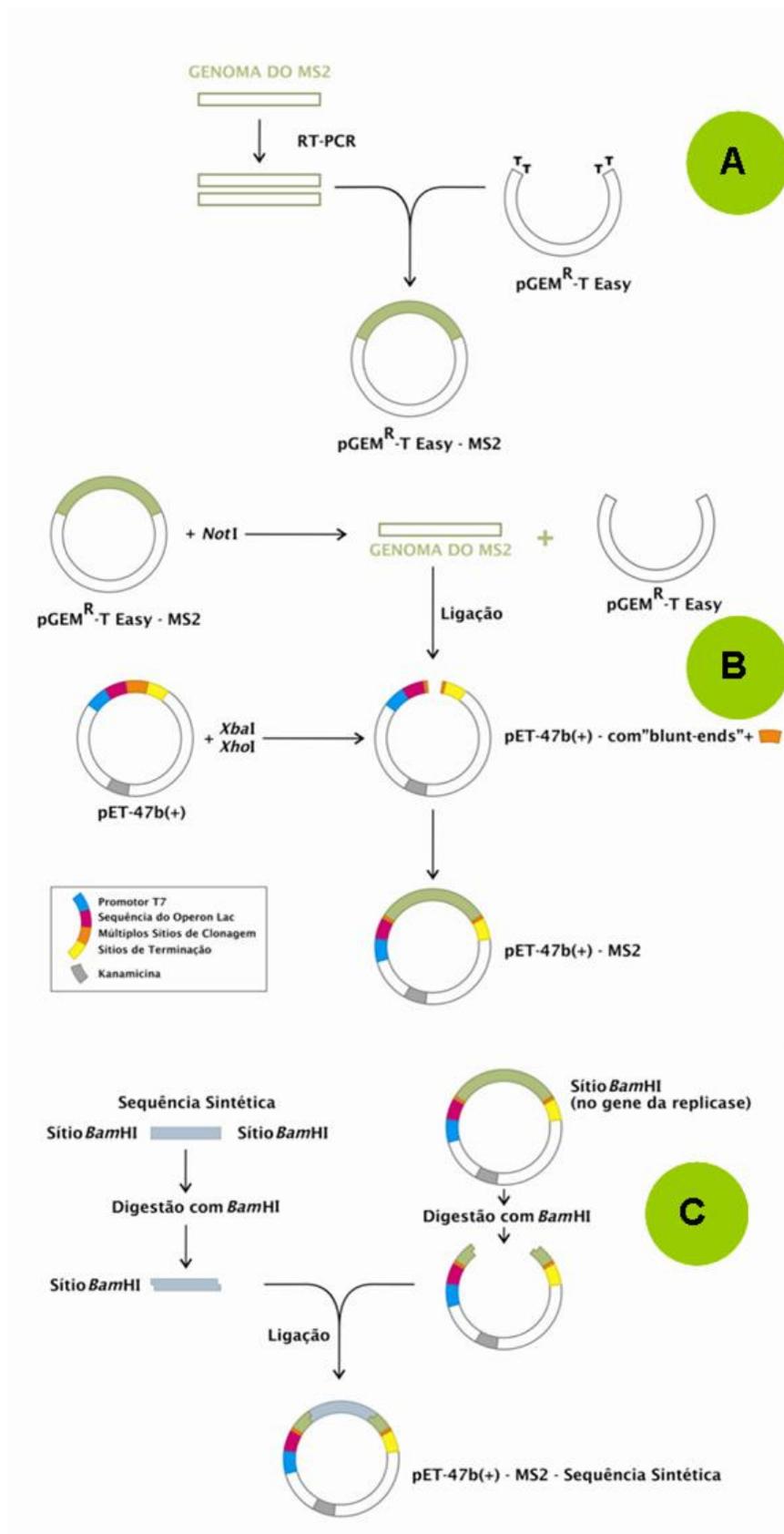
A modificação genética foi feita pela inserção de uma sequência sintética derivada da região 5' UTR do vírus da hepatite C. Desta forma, este controle compartilha sequência de nucleotídeos com este vírus, sendo amplificado pelos mesmos "primers", no ensaio de PCR em tempo real. O que diferencia esta sequência da do HCV, são algumas bases que foram alteradas permitindo o desenho de uma sonda específica que foi usada para distinguir a amplificação deste controle da do HCV na PCR em tempo real multiplex.

A escolha da região do gene da RNA replicase como sendo a região genômica apropriada para a inserção da sequência sintética resultou de uma análise cuidadosa da sequência do MS2, na qual procurou-se identificar as regiões codificantes e regulatórias essenciais para a viabilidade do fago. (*GenBank* NC_001417.1). A mutação produzida neste gene não alterou a montagem da partícula do bacteriófago e garantiu a produção de partículas não infectivas, fato este evidenciado no momento da quantificação dos fagos obtidos, utilizando a técnica de cultura em dupla camada e a bactéria XL1-Blue. Não foram obtidos "plaques" nas placas de titulação.

Uma visão esquemática da montagem desse controle interno está representada na Figura 13.

A Figura 13 A, mostra o genoma do MS2, amplificado por RT-PCR. Esse genoma amplificado contendo as adeninas terminais foi ligado às timinas presentes no vetor pGEM[®]-T Easy, obtendo-se desta forma o pGEM[®]-T Easy - MS2, transformado na bactéria Top10F'. 13 B mostra a montagem do vetor pET-47b(+) - MS2, que iniciou com a digestão dos plasmídeos pGEM[®]-T Easy - MS2, usando a enzima de restrição *NotI*, o que resultou na liberação do genoma do MS2 do vetor. Na sequência este genoma foi ligado no vetor pET-47b(+), com "blunt ends" gerados pela digestão do vetor com as enzimas de restrição *XbaI* e *XhoI*. O resultado desta ligação foi o vetor o pET-47b(+) - MS2, que foi usado para expressar o CI MS2. Em 13 C, está sendo mostrada a digestão da sequência sintética com sítios *BamHI* nas extremidades 5' e 3' com a enzima *BamHI*, e a digestão do sítio *BamHI* presente no gene da replicase do MS2 no plasmídeo pET-47b(+) - MS2. Na sequência as terminações coesivas geradas pelo tratamento enzimático foram ligadas, resultando na montagem pET-47b(+) - MS2 - SS. Esse vetor, conforme mostrado em 13 D, depois de transformado na célula competente BL21(DE3)pLysS foi usado para expressar o bacteriófago MS2 recombinante, que é o controle interno competitivo, que será usado na técnica de PCR em tempo real. 13 E e F mostram a purificação das partículas virais.

O vetor pET-47b(+) - MS2 mostrado em 13 B também foi transformado em BL21(DE3)pLysS e foi usado para expressar o controle interno MS2 que serviu como um material referência na padronização no processo de produção do CIC, por manter suas propriedades de lise e desta forma poder ser titulado. Desta forma, o MS2 quantificado em PFU/ml, foi usado como padrão na quantificação do controle interno competitivo na técnica de PCR em tempo real. Para esta utilização foi necessário fazer-se a otimização e estudo do uso deste controle nesta técnica. Os dados gerados puderam contribuir no entendimento da performance da PCR em tempo real feita com um controle interno competitivo (MS2 com a sequência sintética) e com um controle interno não competitivo (MS2).



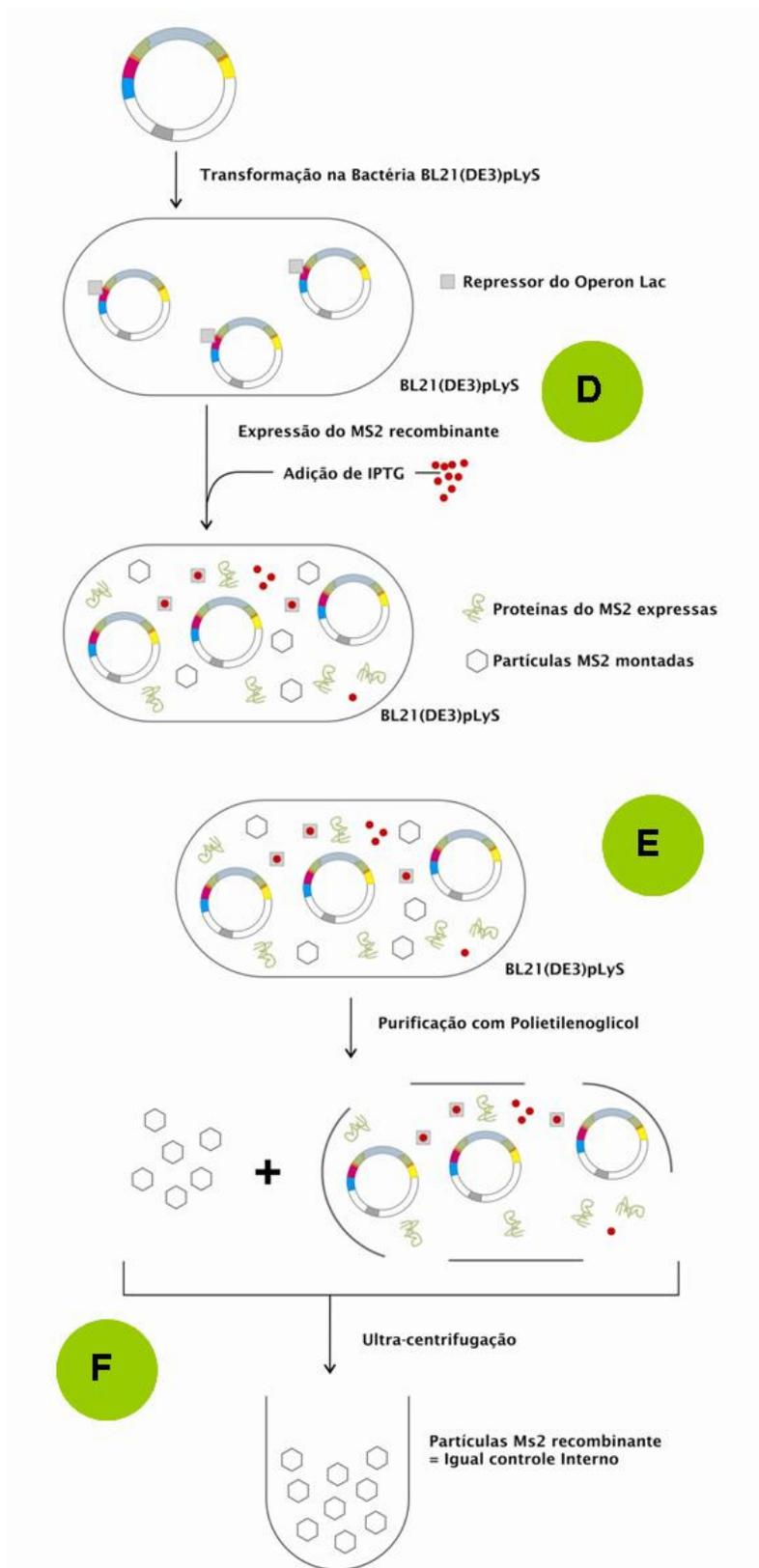


FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MONTAGEM DO CONTROLE INTERNO
 FONTE: A Autora (2010)

4.2 RT-PCR PARA O GENOMA DO BACTERIÓFAGO MS2

Para otimizar uma reação de PCR que resultasse na obtenção das 3.569 bases do genoma do MS2, diversas condições de RT-PCR precisaram ser testadas. Dois conjuntos de oligonucleotídeos CLONMS2-F /CLONMS2-R e -MS2-F1/-MS2R1 (Tabela 1) foram desenhados. Estes oligonucleotídeos diferem em apenas algumas bases, como pode-se observar nas sequências descritas na tabela, pois nossa intenção era obter o genoma inteiro do MS2, e desta forma não havia muitas alternativas para se desenhar os "primers". Os oligonucleotídeos sintetizados foram exaustivamente testados.

A Figura 14 mostra os resultados de alguns testes realizados e que foram mais significativos. O protocolo base para a transcrição reversa está descrito no Item 3.8.2 e para a PCR no Item 3.8.3. As modificações propostas foram adaptadas a esse protocolo. Nas reações de 1 a 6 utilizou-se 1, 2, 4, 6, 8, e 10 mM de $MgCl_2$ e 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase. Obteve-se bandas até a concentração 6 mM. Nas reações 7 e 8 utilizou-se 2 e 4 mM de $MgCl_2$ e 5 U da enzima Taq DNA polimerase, o dobro da quantidade de enzima que estava sendo utilizada. Os "primers" usados nestes testes foram o MS2-F1 e o MS2-R1. Nas duas últimas PCR(s), a quantidade de material amplificado foi maior do que nas outras, mostrando que a mudança de concentrações de $MgCl_2$ não acrescentou melhorias significativas no processo, no entanto o aumento da concentração de enzima parece ter tido maior influência. No entanto, ainda assim todas as reações tinham produtos inespecíficos e a banda esperada estava presente em uma quantidade muito baixa que não era suficiente para desenvolver os passos subsequentes do projeto. Uma quantidade maior do produto específico foi obtida, para os dois conjuntos de "primers" disponíveis quando se utilizou a enzima GoTAQ™ DNA Polymerase que é Taq DNA Polymerase da Promega original em uma nova formulação. Primeiramente, a reação foi feita usando o protocolo recomendado pela empresa, para o qual não foram obtidos resultados. Adaptou-se então o protocolo que havia sido utilizado nos testes anteriores, descrito no Item 3.8.3, porém utilizou-se o tampão próprio da enzima, contendo $MgCl_2$ para uma concentração final de 1,5 mM, e colocou-se na

reação 5 U da enzima, ou seja 4 vezes mais em relação ao recomendado pelo fabricante (0,25 ul). Os resultados obtidos para a amplificação feita com esta enzima podem ser visualizados na Figura 15. Na imagem obtida observa-se que o padrão de amplificação do fragmento com 3.569 bases foi superior aos outros obtidos, ficando evidente a participação da enzima na melhoria do processo. Reações inespecíficas continuaram a acontecer e por esta razão todo o volume de material foi submetido a eletroforese em gel agarose 0,8% e a banda correspondente ao tamanho esperado foi cortada do gel, eluída do mesmo e purificada. Após a purificação foram obtidos 610 ng de ácido nucleico, correspondendo ao genoma do MS2, quantidade esta que foi suficiente para a construção dos vetores que garantiram a expressão dos controles internos.

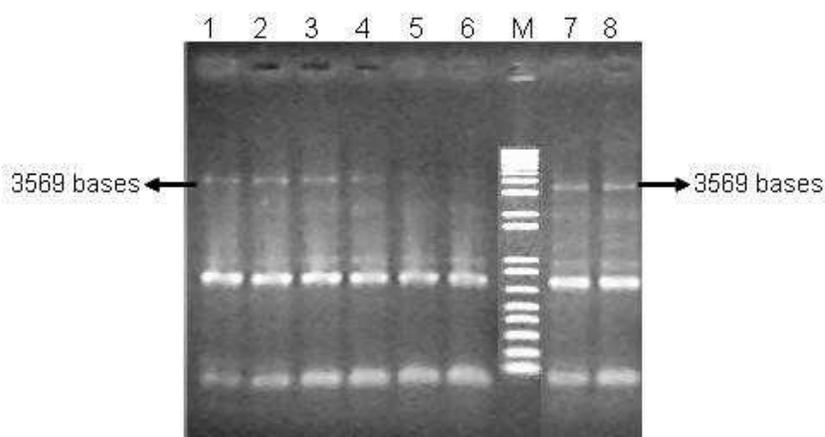


FIGURA 14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DO PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DO MS2 EM PCR(S) FEITAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE REAGENTES

NOTA: Os amplicons de 1 - 6 resultaram das reações de PCR feitas com 1, 2, 4, 6, 8 e 10 mM de $MgCl_2$ e 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase, respectivamente. Os amplicons 7 e 8 são das reações feitas com 2 e 4 mM $MgCl_2$ e 5 U da enzima Taq DNA polimerase. M = marcador 1 KB Plus.

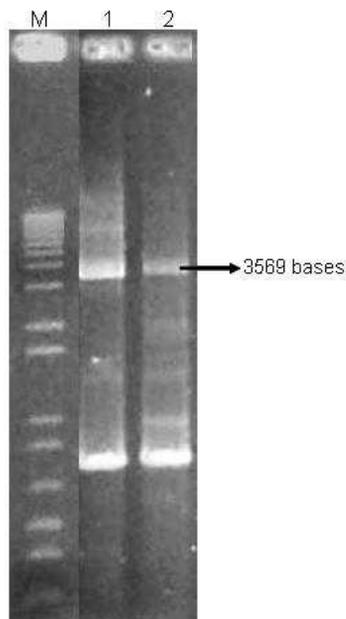


FIGURA 15 - PERFIL ELETROFORÉTICO PARA O PRODUTO DA AMPLIFICAÇÃO DO MS2 COM A ENZIMA GoTaq™ DNA POLYMERASE

NOTA: M: marcador 1Kb Plus;

1: genoma do MS2 amplificado com os "primers" CLON-F E CLON-R;

2: genoma do MS2 amplificado com os "primers" MS2-F1 e MS2-R1.

4.3 CONSTRUÇÃO DO VETOR pGEM® -T Easy - MS2

A ligação do genoma do MS2 ao vetor pGEM® -T Easy, foi feita usando 147 ng do MS2, obtido por RT-PCR e com a enzima T4 DNA ligase. Essa ligação foi possível porque o produto de PCR contém as adeninas inseridas pela enzima GoTaq™ DNA Polymerase e o vetor pGEM®-T Easy, as timinas presentes nas terminações onde acontecem as ligações dos produtos de PCR para clonagem. O produto da ligação foi transformado na célula competente Top10F'. Foram obtidas 38 colônias brancas, contendo clones resistentes à ampicilina e incapazes de produzir β-galactosidase, que foram transferidas para uma placa de meio LB contendo X-Gal/IPTG/Amp. Quatro clones não cresceram. Desta forma somente 34 clones foram submetidos à técnica de "tooth-pick" para triagem dos clones contendo o vetor recombinante. O genoma do bacteriófago MS2 têm 3.569 bases, e o pGEM®-T Easy 3.015 pares de bases, totalizando a junção vetor - inserto 6.584 pares de bases.

Nesta técnica apenas um clone, apresentou padrão eletroforético distinto dos demais e semelhante ao vetor GFP com 7.000 pares de bases, utilizado como controle para facilitar a identificação do clone recombinante na técnica "toothpick". Este clone pode ser visto na Figura 16 que mostra os resultados da técnica "tooth pick"

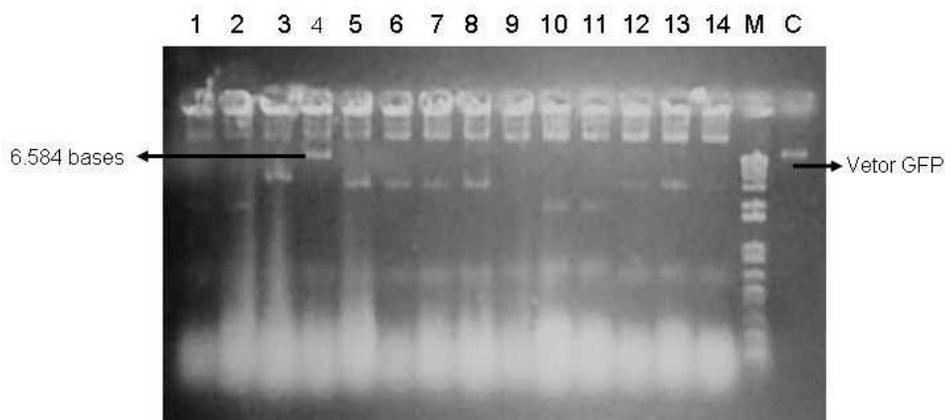


FIGURA 16 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES DA TRANSFORMAÇÃO DA LIGAÇÃO DO MS2 AO pGEM[®]-T Easy APÓS À TÉCNICA DE "TOOTH PICK"

NOTA: O clone contendo o vetor pGEM[®]-T Easy - MS2 aparece na eletroforese aproximadamente na mesma posição que o vetor GFP com 7.000 pares de bases, usado como controle.

Com o objetivo de multiplicar o clone recombinante, este foi inoculado em 3 ml de meio LB/ampicilina. Após incubação do inóculo a 37°C, durante 18 horas, obteve-se o plasmídeo (vetor pGEM[®]-T Easy - MS2). A Figura 17 mostra o resultado da eletroforese feita para a solução de plasmídeos.

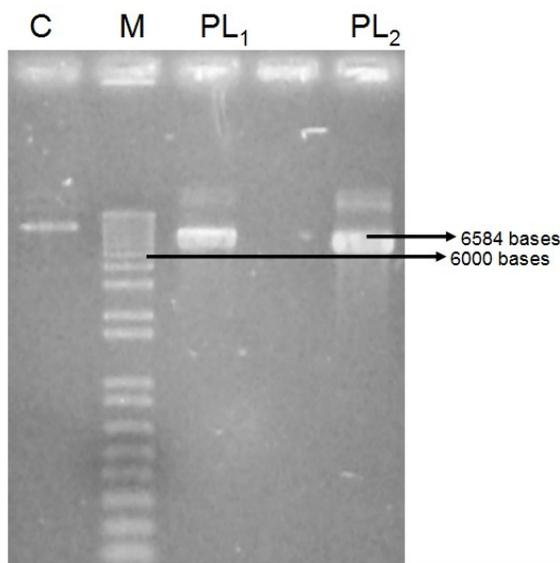


FIGURA 17 - ELETROFORESE PARA O VETOR pGEM[®]-T Easy - MS2

NOTA: C é o vetor GFP, usado como controle, com 7.000 pares de bases;
M é o marcador 1 Kb Plus, PL1 e PL2 correspondem ao vetor pGEM[®]-T Easy com o genoma do MS2 inserido.

Para efetivamente comprovar a inserção das 3.569 bases do genoma do bacteriófago MS2, no vetor pGEM[®]-T Easy foram utilizadas duas enzimas: *NotI* que reconhece a sequência 5'GC▼GGCCGC3', presente no vetor pGEM[®]-T Easy, porém ausente na sequência de nucleotídeos do bacteriófago MS2. Desta forma esta enzima separou o vetor do inserto, gerando um fragmento com 3.569 bases do MS2 mais 35 bases do vetor totalizando 3.604 bases e outro com 2.980 bases do vetor. Este resultado pode ser visto na Figura 18.

A segunda enzima utilizada foi a *EcoRI*, proveniente da *Escherichia coli* com a sequência de reconhecimento 5'G▼AATTC3'. Esta sequência não existe no vetor, porém está presente no MS2 nas posições 103/107 e 1628/1632. Os fragmentos obtidos podem ser vistos na Figura 18, que mostra um fragmento com 3.015 bases (vetor), e na sequência outros três fragmentos um com 1.941 bases, outro com 1.527 bases, e o terceiro com 101 bases. Estes resultados confirmam a montagem do vetor - pGEM[®]-T Easy - MS2.

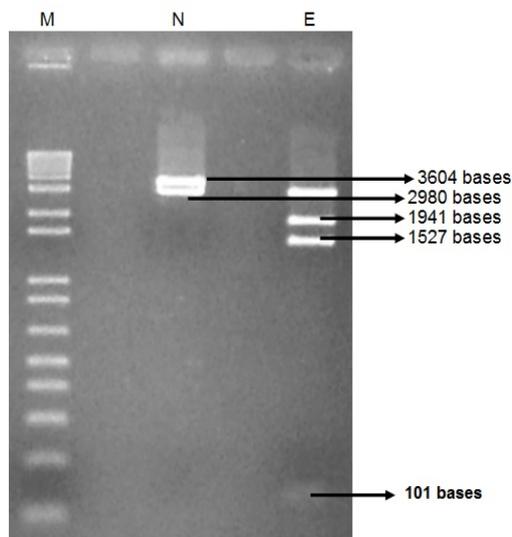


FIGURA 18 - DIGESTÃO pGEM[®]-T Easy - MS2 COM *NotI* E *EcoRI*

NOTA: M é o marcador 1 KB Plus. Em N estão os produtos da digestão do pGEM[®]-T Easy-MS2 com enzima *NotI*. O fragmento com 3.604 bases corresponde ao genoma do MS2 mais 35 bases do vetor e o fragmento com 2.980 bases são do vetor pGEM[®]-T Easy. Os produtos da digestão com *EcoRI* estão representados em E pelos fragmentos com 3.015, 1.941 e 1.527 bases. O fragmento com 101 bases aparece fraco.

Além do tratamento com enzimas de restrição, submeteu-se os plasmídeos obtidos, a sequenciamento com o objetivo de verificar se, durante o processo de amplificação, não houve incorporação incorreta de bases pela enzima GoTAQ[™] DNA Polymerase, utilizada na PCR, que pudessem gerar quadros de leitura incorretos, impedindo a expressão de bacteriófagos viáveis em fases posteriores do trabalho. Utilizou-se neste sequenciamento os "primers" MS2-F2 e MS2-R3, desenhados para a sequência de nucleotídeos do MS2, e que estão mostrados na Tabela 1. Os resultados foram analisados alinhando-se os dados obtidos no sequenciamento em relação a sequência do MS2 ref. NC_001417.1, disponível no "GenBank". A análise deste alinhamento mostrou que a sequência amplificada tinha os mesmos nucleotídeos que a sequência de referência e que, portanto as bases foram inseridas corretamente durante a amplificação.

4.4 CONSTRUÇÃO DO VETOR pET47b(+) - MS2

Para expressar as partículas do bacteriófago, foi necessário transferir o genoma do MS2 para o vetor de expressão pET-47b(+), que contém o promotor T7 para a enzima T7 RNA polimerase da célula hospedeira, no caso a bactéria BL21(DE3)pLysS, uma sequência que termina a transcrição e um sítio específico para ligação do ribossomo. A escolha da estratégia “blunt ends”, para a montagem deste vetor resultou de uma análise das enzimas de restrição que poderiam ser utilizadas para gerar terminações compatíveis no genoma do MS2 e no vetor.

Não foram identificadas enzimas com sítios de restrição no pET-47b(+) e com sítios no vetor pGEM[®]-T Easy - MS2 que permitisse a separação do MS2 íntegro deste vetor, uma vez que precisávamos dispor do genoma do bacteriófago por inteiro. Além disto, houve a necessidade de se excluir do vetor pET-47b(+) o sítio *Bam*HI, sítio este presente no gene da replicase do MS2 e escolhido para a inserção da sequência sintética. A retirada deste sítio foi feita digerindo-se o pET-47b(+) com as enzimas *Xba*I e *Xho*I. Este processo de digestão excluiu do vetor um fragmento com 255 pares de bases, que corresponde as sequências localizadas entre os sítios de *Xba*I e *Xho*I. Nesta sequência esta presente o sítio de restrição da enzima *Bam*HI, e também sítios específicos de outras enzimas como pode-se observar na Figura 19 na qual a região sublinhada em azul representa a sequência de bases eliminada do pET-47b(+).

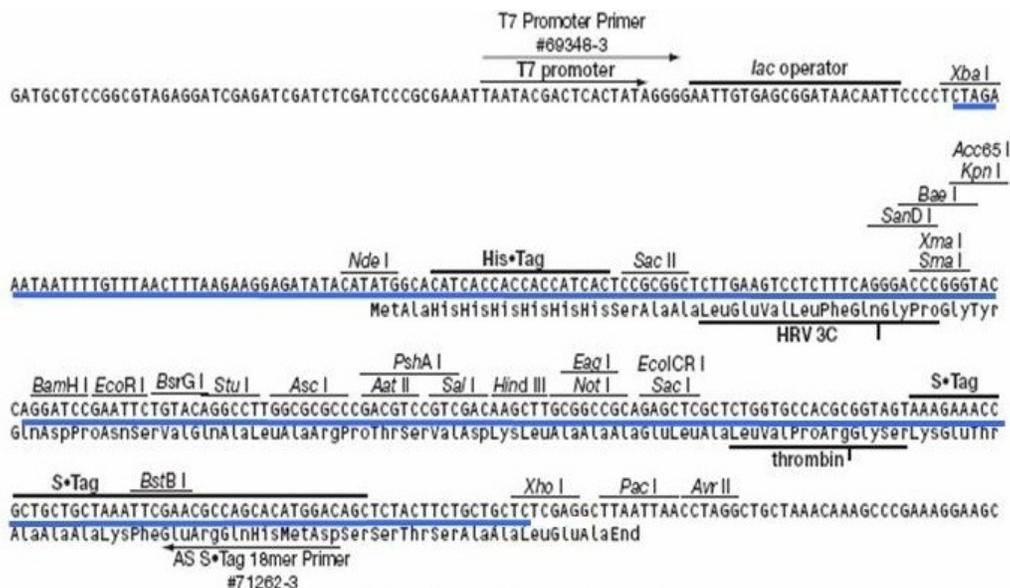


FIGURA 19 - SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DE CLONAGEM DO VETOR pET-47b(+)

NOTA: As bases sublinhadas em azul estão localizadas entre os sítios de restrição das enzimas XbaI e XhoI. Os 255 nucleotídeos localizados entre os sítios de restrição das duas enzimas foram retirados do vetor após a digestão com as mesmas.

Na digestão além do fragmento com 255 bases que não foi usado, gerou-se um segundo com aproximadamente 4.948 bases, que é a região do vetor de interesse, que foi cortado, purificado e submetido à técnica de “Fill in” e de defosforilação. O resultado desta estratégia foi a obtenção do vetor pET-47b(+), com finais “blunt- ends”, pronto para ser ligado ao genoma do MS2.

Simultaneamente ao preparo do vetor pET-47b(+), foi feita a separação da sequência de nucleotídeos do bacteriófago MS2 do pGEM[®]-T Easy - MS2, usando a enzima de restrição *NotI*, que têm sítios de restrição somente no vetor, mantendo desta forma a sequência de nucleotídeos do bacteriófago íntegra para ser ligada ao vetor pET-47b(+).

O produto da digestão enzimática na eletroforese em agarose gel a 1% gerou um fragmento com 2.980 bases, que é o vetor pGEM[®]-T Easy e outro fragmento com 3.604 bases, que é o genoma do MS2 mais 35 bases do vetor. O fragmento maior com 3.604 bases foi cortado, eluído do gel e purificado. As extremidades 3' geradas pelo corte com a enzima de restrição foram preenchidas utilizando a técnica “Fill in”. Com estes procedimentos obtivemos o genoma do MS2

em toda a sua extensão e com as extremidades "blunt ends" preparadas para ser ligadas ao vetor pET-47b(+).

A Figura 20 mostra os resultados obtidos na eletroforese feita para os fragmentos prontos correspondendo ao genoma do MS2 e do pET-47b(+).

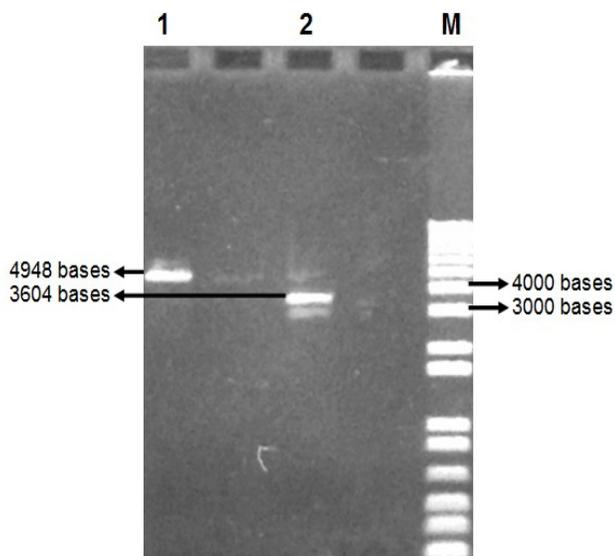


FIGURA 20 - PERFIL ELETROFORÉTICO DA DIGESTÃO DO pET-47b(+) COM AS ENZIMAS *Xba*I E *Xho*I E DO pGEM[®]-T Easy - MS2 COM *Not*I

NOTA: 1 é o fragmento com 4.948 bases do vetor pET-47b (+) após a digestão enzimática e 2 o fragmento com 3.604 bases do genoma do MS2. M é o Kb Plus.

Estes fragmentos foram ligados e o produto da ligação foi transformado em bactérias Top10F' eletrocompetente. 150 clones gerados na transformação foram transferidos para placas numeradas contendo o meio LB/canamicina. Estes clones foram triados através da técnica de "tooth-pick". Apenas 1 clone, o número 77, apresentou na eletroforese, padrão de corrida distinto, sugerindo a inserção do MS2 no vetor. A Figura 21 mostra o resultado da eletroforese onde foi identificado esse clone contendo o inserto.

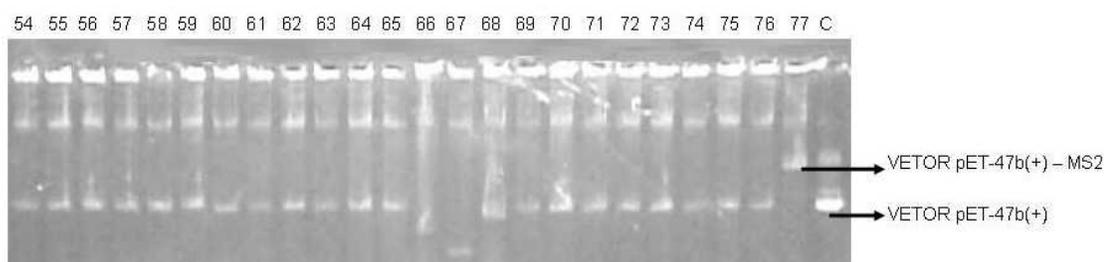


FIGURA 21 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE CLONES DA TRANSFORMAÇÃO DA LIGAÇÃO pET-47b(+) AO MS2 APÓS À TÉCNICA DE "TOOTH PICK"

NOTA: O clone indicado apresentou um padrão distinto de migração no gel, em relação ao vetor pET-47b(+) sem inserto usado como controle, sugerindo a presença do pET-47b(+) - MS2.

Este clone foi multiplicado, inoculando-se o mesmo em meio LB/canamicina, e o plasmídeo foi extraído e purificado utilizando o kit "QIAprep Spin Miniprep". O plasmídeo obtido foi transformado na célula competente BL21(DE3)pLysS, que contém o gene para a enzima T7 RNA polimerase, essencial para a expressão de qualquer fragmento inserido no vetor pET-47b(+).

Comprovou-se a inserção do MS2 no vetor pET-47b(+), através de 10 reações de PCR, usando como molde os plasmídeos obtidos. Estas PCRs foram feitas usando diversas combinações de "primers". As sequências destes "primers" estão distribuídas em diferentes regiões genômicas do MS2 e estão descritas na Tabela 1 do Item 3.8.1. Na Tabela 5 constam as diferentes combinações de "primers" testados e os fragmentos esperados para cada uma destas combinações. A Figura 22 é uma representação esquemática da localização dos "primers" no genoma do MS2.

TABELA 5 - COMBINAÇÕES DE "PRIMERS" USADAS PARA COMPROVAR A INSERÇÃO DO MS2 NO VETOR PET-47B(+)

Conjunto de "primers"	Fragmentos Esperados (bases)
MS2-F1 e MS2-R1	3.569
Clon -F e Clon- R	3.569
MS2-F4 e MS2-R2	573
MS2-F4 e MS2-R1	1.863
MS2 -F1 e MS2-R4	1.743
MS2- F2 e MS2- R2	1.184
T7 promoter e MS2R1	3.616.
T7 promoter e MS2R2	2.279
T7 promoter e MS2R3	1.130
T7 promoter e MS2R4	1.743

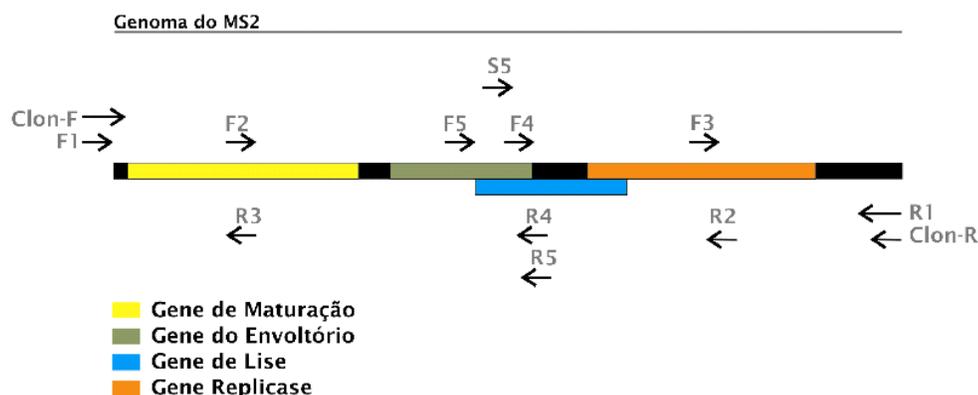


FIGURA 22 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DOS "PRIMERS" DESENHADOS NO GENOMA DO MS2

Os produtos que resultaram das reações de PCR foram submetidos à corrida eletroforética. Os resultados obtidos com os seis primeiros conjuntos de "primers" para o MS2 estão mostrados na Figura 23, onde se pode observar que os fragmentos obtidos correspondem aos fragmentos esperados, comprovando a inserção do genoma do bacteriófago no vetor no sentido correto.

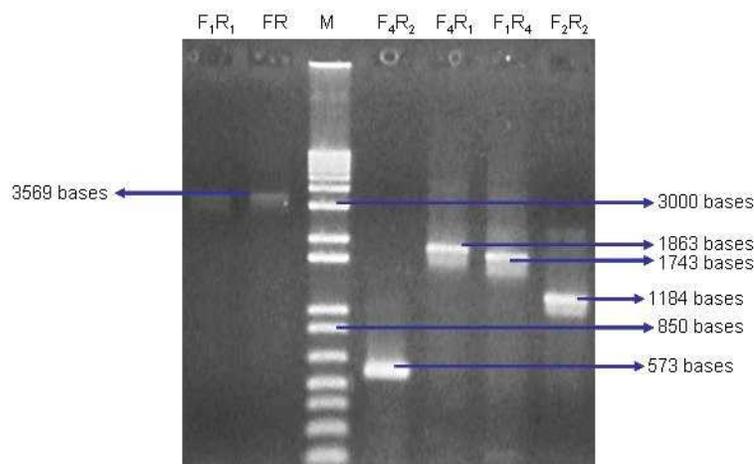


FIGURA 23 - PERFIL ELETROFORÉTICO DOS AMPLICONS OBTIDOS NAS PCR(S) FEITAS PARA COMPROVAR A PRESENÇA DO MS2 NO VETOR pET47b(+)

NOTA: As PCR(s) foram feitas usando diferentes combinações de "primers". F1R1 é o produto da amplificação obtida com MS2-F1 e MS2-R1, FR resultou de CLON-F em combinação com - CLON-R, F4R2 é o amplicon da PCR feita com MS2-F4 e MS2-R2, F4R1 resultou da combinação dos "primers" MS2-F4 e MS2-R1, F1R4 foi gerado por MS2-F1 e MS2-R4, e F2R2 resultou do MS2-F2 e MS2-R2. M é o marcador 1Kb Plus.

Nas outras 4 reações de PCR utilizou-se o "primer" T7 promoter, em combinação com os "primers" reversos desenhados para o MS2. Estas PCR(s) foram feitas para verificar se a inserção tinha a orientação correta. Os resultados obtidos na eletroforese dos produtos da amplificação estão mostrados na Figura 24, na qual observa-se que obteve-se os fragmentos com tamanho esperado em cada uma das reações realizadas. Estes resultados, comprovam efetivamente que a inserção do MS2 no vetor ocorreu na região 5'.

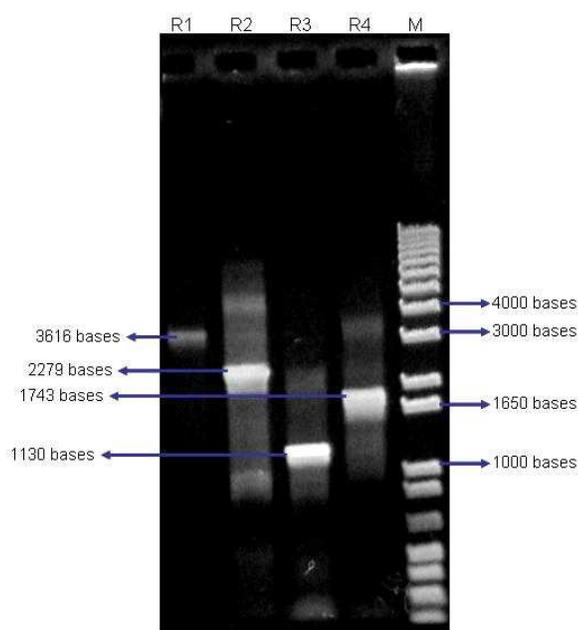


FIGURA 24 - AMPLICONS DE PCR(S) FEITAS COM O "PRIMER" T7 PROMOTER EM COMBINAÇÃO COM "PRIMERS" REVERSOS ESPECÍFICOS PARA O MS2

NOTA: M é o marcador 1 KB Plus. R1, R2, R3 e R4 são os amplicons produzidos na amplificação com os "primers" reversos MS2-R1, MS2-R2, MS2-R3 e MS2-R4 respectivamente

4.5 CONTRUÇÃO pET-47b(+)-MS2-SS

O vetor pUC57 - SS foi transformado na célula competente DH5 α . Um clone que resultou desta transformação foi cultivado e a partir dele, obteve-se 500 μ l de solução de plasmídeo com concentração de 0,125 μ g/ μ l. Para liberar a sequência de nucleotídeos do gene sintético do vetor pUC57 foi feita a digestão com a enzima de restrição *Bam*HI. Colocou-se o produto dessa digestão em gel de agarose 1,2%.

Após a eletroforese, o fragmento com 144 bases correspondendo a sequência sintética foi cortado, eluído do gel e purificado. Este fragmento pode ser observado na Figura 25.

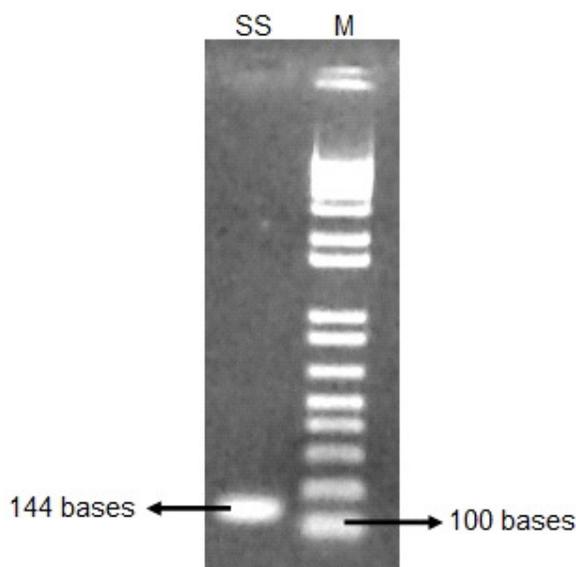


FIGURA 25 - DIGESTÃO pUC57 - SS COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bam*HI

NOTA: SS é a sequência sintética com 144 bases.

O pET47b(+) - MS2, também foi digerido com a enzima *Bam*HI (Figura 26). Esta enzima não têm sítio de restrição no vetor pET, no entanto um único sítio desta enzima esta presente no gene da enzima RNA replicase no genoma do MS2 inserido no vetor. Desta forma foram geradas terminações coesivas neste gene. O produto desta digestão foi defosforilado com a enzima fosfatase alcalina de camarão, garantindo a linearidade da molécula, e em seguida foi purificado.

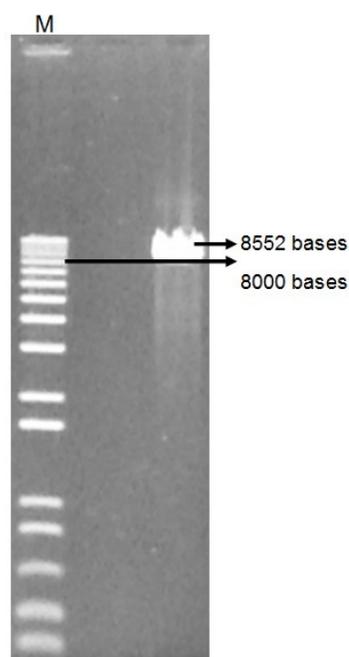


FIGURA 26 - ELETROFORESE PARA O PRODUTO DA DIGESTÃO DO VETOR pET47b(+) - MS2 COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Bam*HI

NOTA: O fragmento com 8.552 bases corresponde ao vetor pET47b(+) - MS2, após a digestão enzimática.

As terminações da sequência sintética formadas pela digestão com *Bam*HI foram ligadas às terminações *Bam*HI geradas no genoma do MS2. Transformou-se o produto desta ligação na célula competente DH5 α . Nas placas LB resultantes desta transformação foram selecionados 200 clones. Para a triagem dos clones contendo MS2 recombinante, ou seja, contendo o genoma do MS2 com a sequência sintética inserida, foi feita PCR com os "primers" MS2-F4 e MS2-R2, descritos na Tabela 1. O fragmento esperado para a amplificação do MS2 usando estes "primers" deveria ter 573 bases e para o MS2 contendo a sequência sintética, 717 bases (573 bases do MS2 + 144 bases da sequência sintética). A PCR foi feita inicialmente para 50 colônias. A Figura 27 A e B, mostram os resultados destas amplificações. Trinta e oito clones com 717 bases podem ser observados nestas fotografias.

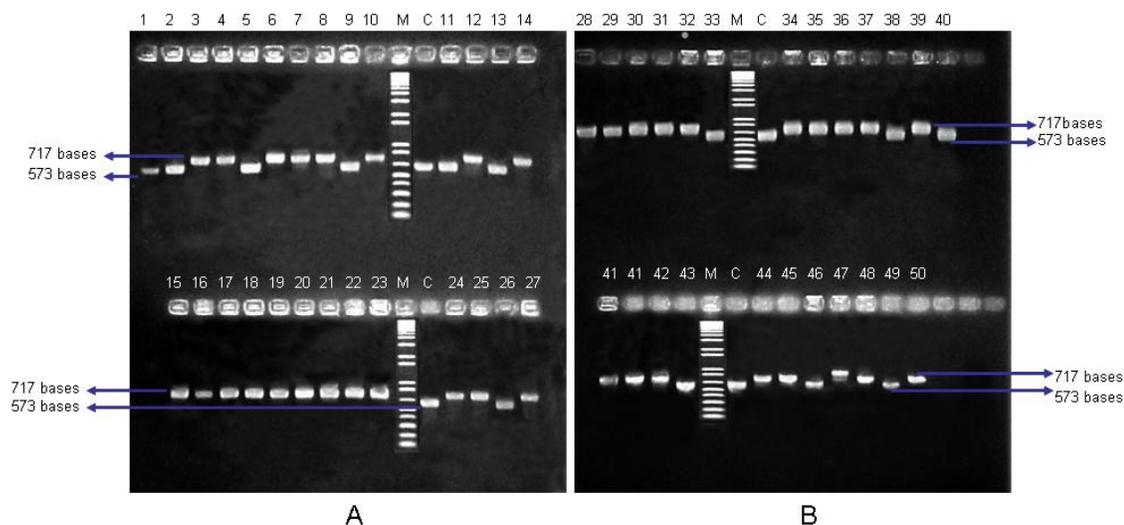


FIGURA 27 - A E B: AMPLICONS OBTIDOS NA PCR FEITA COM OS "PRIMER"S MS2-F4 E MS2-R2 PARA A TRIAGEM DOS CLONES COM O VETOR pET47b(+)-MS2-SS

NOTA: Os amplicons com 573 bases correspondem a sequência de nucleotídeos do MS2. Os fragmentos com 717 bases correspondem a sequência de nucleotídeos do bacteriófago recombinante, ou seja, com a sequência sintética.

Outra PCR foi feita, usando a combinação de "primers" HCV-F e MS2-R2 descritos na Tabela 1. Esta PCR com estes "primers" permitiu verificar se a sequência sintética foi inserida corretamente, no sentido 5' - 3' e também comprovou a inserção dessa sequência uma vez que nela estão presentes as sequências de bases específicas para o "primer" HCV-F. O MS2 sem mutação não contém esta sequência de bases.

Vinte e quatro clones que produziram fragmentos com 717 bases, na amplificação com MS2-F4 e MS2-R2, foram submetidos a esta segunda reação de PCR. Como pode-se observar na Figura 28 A e B, todos os clones foram amplificados, alguns deles apresentaram um padrão de reação fraco, mas a banda com 366 bases pode ser visualizada para todos os clones submetidos a PCR. O padrão desta reação poderia ser melhorado, entretanto os resultados obtidos foram suficientes para indicar os clones com a sequência sintética e dar continuidade às fases subsequentes do trabalho.

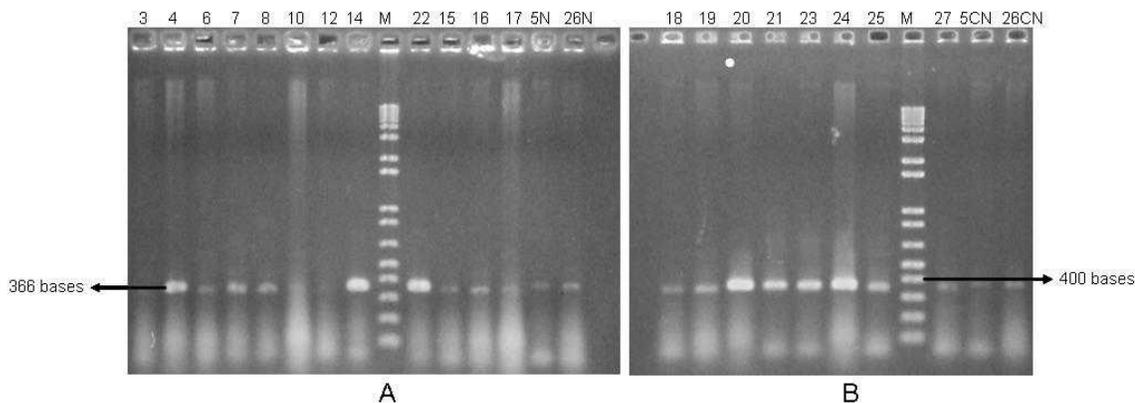


FIGURA 28 - A E B: AMPLICONS DA PCR FEITA COM OS "PRIMERS" HCV-F E MS2-R2 PARA OS CLONES DA TRANSFORMAÇÃO DA LIGAÇÃO DA SEQUÊNCIA SINTÉTICA AO VETOR pET-47b(+)-MS2

NOTA: O "primer" HCV é específico para esta sequência. Desta forma, somente os clones com esta sequência inserida no gene da replicase foram amplificados nesta reação gerando o fragmento com 366 bases.

Para a obtenção de plasmídeos inoculou-se alguns clones (18, 19, 20, 21 e 23) no meio LB/canamicina. Os plasmídeos obtidos a partir dessas culturas foram transformados na bactéria BL21(DE3)pLysS. Os clones derivados da transformação foram usados nos experimentos para a expressão do controle interno competitivo.

Os plasmídeos obtidos foram enviados para a empresa Macrogen (Coréia), para sequenciamento usando os "primers" MS2-F1, MS2-R1, MS-F2, MS2-R2, MS2-F3, MS2-R3, MS2-F4, MS2-R4, descritos na Tabela 1, T7 "promoter", T7 "terminator". Os resultados obtidos foram comparados com a sequência de nucleotídeos do bacteriófago MS2 NC_001417.1 disponível no GenBank. Estes resultados foram analisados, após o alinhamento das sequências. Não foram localizadas inserções incorretas de bases que pudessem afetar a expressão de partículas de bacteriófagos viáveis. No resultado do sequenciamento com o "primer" MS2-F4 está presente a sequência de nucleotídeos do gene sintético inserido no genoma do bacteriófago, confirmando-se efetivamente a construção do plasmídeo pET-47b(+)-MS2- Sequência Sintética.

4.6 EXPRESSÃO DO CONTROLE INTERNO MS2 E DO CONTROLE INTERNO COMPETITIVO (MS2 RECOMBINANTE)

O vetor contruído pET-47b(+) - MS2, transformado em BL21(DE3)pLysS, foi usado para expressar partículas do MS2, enquanto que o pET-47b(+) - MS2 - SS também em BL21(DE3)pLysS foi usado para expressar o bacteriófago recombinante.

Testou-se diversos protocolos em mini-escala com o objetivo de estabelecer o que resultaria em um melhor padrão de expressão das partículas de bacteriófago. As variáveis avaliadas foram as diluições do inóculo, momento do crescimento celular para se fazer a adição de IPTG e tempo de crescimento das bactérias após a adição de IPTG. Todos os lisados que resultaram destas testagens foram quantificados pela técnica de cultura em dupla camada.

Destes protocolos, níveis ótimos de lise bacteriana, decorrente da expressão do MS2, foram obtidos diluindo-se o pré-inóculo da bactéria 1×10^{-2} e fazendo-se a adição de 1 mM de IPTG no momento em que a cultura de bactérias na espectrometria a 600 nm apresentava leituras em torno de 0,500. Adição de IPTG em inóculos mais concentrados (DO 1,200) não produziu lise bacteriana visível, devido ao grande número de microorganismos presentes, da mesma forma, concentrações muito baixas de bactérias produziram baixos níveis de expressão de MS2. Portanto a padronização do inóculo é essencial na expressão das partículas de bacteriófago.

A expressão em larga escala do MS2 foi feita preparando-se 500 ml de inóculo da bactéria BL21(DE3)pLysS, transformada com o vetor pET-47b(+) - MS2. Foram coletadas amostras em diferentes momentos para avaliação do crescimento bacteriano. Obteve-se na primeira hora DO = 0,131, na segunda hora, 0,195, e na terceira hora, 0,630. Neste momento foi feita a adição de IPTG e foram obtidas novas amostras para monitoração da expressão do MS2. A primeira amostra foi coletada 1 hora após ter sido colocado o IPTG e a leitura da densidade ótica lida foi igual a 1,120, sugerindo que a BL21 continuou a crescer. Na segunda, terceira e quarta hora as DO(s) foram: 0,936, 0,350 e 0,283, respectivamente. Estes resultados mostram que a bactéria teve seu crescimento interrompido e que os genes do MS2 presentes no vetor foram expressos, ocorrendo então no citoplasma celular a montagem das partículas do bacteriófago, responsáveis pela lise das bactérias.

O bacteriófago recombinante também foi expresso preparando-se 500 ml de inóculo da BL21(DE3)pLysS contendo o vetor pET-47b(+) - MS2 - SS. O pré-inóculo foi diluído 1×10^{-2} e as leituras da DO 1, 2, 3 e 4 horas após a incubação da cultura foram: 0,033, 0,180, 0,392 e 0,608. Neste momento foi feita a adição de IPTG 1mM e também monitorou-se o crescimento bacteriano 1, 2 e 3 horas após a indução, com respectiva leitura de DO de 0,720, 0,243 e 0,180, indicando que houve a expressão das proteínas do bacteriófago, a montagem das partículas virais no citoplasma bacteriano e finalmente a lise bacteriana.

Os lisados do MS2 e do MS2 recombinante foram separados dos debris celulares por meio de centrifugação. As partículas dos bacteriófagos que permaneceram em suspensão no sobrenadante foram purificadas usando polietilenoglicol (PEG) e precipitação em ultra-centrífuga.

O precipitado contendo MS2 foi resuspenso em 9 ml de meio SM, e o precipitado contendo o MS2 recombinante, foi resuspenso em 3 ml de meio SM.

O MS2 foi quantificado por meio da técnica de cultura em dupla camada que se baseia na propriedade dos bacteriófagos de causar lise nas células hospedeiras. Esta técnica foi feita colocando-se na superfície de um meio de cultura sólido uma suspensão de bactérias XL1-Blue e de MS2 misturados com um meio de cultura contendo ágar-soft. As alterações produzidas na célula pela presença do fago puderam ser observadas pelo aparecimento de placas ou focos de infecção, denominadas de PFU (*Plaque Forming Unit*), na superfície do ágar.

Primeiramente foram testadas 3 diluições preparadas a partir da suspensão de MS2, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000. Em um segundo momento a titulação foi feita a partir das diluições 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1:1.600. Cada uma destas diluições foi incubada durante 30 minutos com a bactéria XL1-Blue devidamente preparada. Foram feitas duplicatas para cada diluição. Adicionou-se o ágar-soft a 42°C e imediatamente verteu-se o conteúdo para a superfície de uma placa LB com tetraciclina. Para controle foi feito um tubo contendo somente a bactéria XL1-Blue.

Após a incubação das placas por 18 horas a 37°C, foi feita a contagem das PFU(s) obtidas em cada uma delas. As contagens obtidas para cada diluição e os respectivos valores de PFU/ml estão descritos na Tabela 6. Baseando-se nestas contagens estabeleceu-se que o valor médio de PFU(s)/ml obtido para o MS2 foi de $2,0 \times 10^6$ PFU/ml.

TABELA 6 - TITULAÇÃO DO MS2 PELA TÉCNICA DE CULTURA EM DUPLA CAMADA

Diluição do MS2	Nº de PFU contadas	PFU/ml
1: 100	386	$1,93 \times 10^6$
	420	$2,10 \times 10^6$
1:1000	39	$1,95 \times 10^6$
	56	$2,80 \times 10^6$
1:10.000	4	$2,00 \times 10^6$
	5	$2,50 \times 10^6$
1 : 50	540	$1,30 \times 10^6$
	543	$1,30 \times 10^6$
1 : 100	400	$2,00 \times 10^6$
	406	$2,00 \times 10^6$
1 : 200	205	$2,05 \times 10^6$
	229	$2,29 \times 10^6$
1 : 400	99	$1,98 \times 10^6$
	96	$1,90 \times 10^6$
1 : 800	70	$2,80 \times 10^6$
	77	$3,00 \times 10^6$
1 : 1600	26	$2,08 \times 10^6$
	37	$2,80 \times 10^6$
Valor médio PFU/ml		$2,15 \times 10^6$

As partículas de MS2 recombinante foram quantificadas na técnica de PCR em tempo real descrita no Item 3.21. Estas partículas também foram submetidas à técnica de cultura em dupla camada. Porém não foram produzidas PFU nas placas. A explicação para este resultado está relacionada a mutação produzida pelo gene sintético inserido no gene da replicase que conferiu ao bacteriófago recombinante a perda da capacidade de replicação. O MS2 infecta a bactéria XL1-Blue, porém não se replica e as partículas presentes não são suficientes para produzir a lise bacteriana.

Portanto o MS2 recombinante atendeu aos objetivos deste trabalho, pois poderá ser usado como controle interno competitivo (CIC) específico para o HCV, será produzido apenas a partir de plasmídeo, já que perdeu sua capacidade de replicação e controlará todas as etapas de um teste diagnóstico, desde a extração até a amplificação.

4.7 OPTIMIZAÇÕES PCR EM TEMPO REAL “TWO STEP”

4.7.1 Controle Interno MS2 - Amplificação com SYBR® GREEN

O conjunto de "primers" MS2-F5 e MS2-R5, demonstrou-se eficiente na amplificação de uma região do genoma do bacteriófago MS2 obtido a partir do plasmídeo pET47b(+) - MS2. No teste feito com o sistema SYBR®Green, usando o cDNA do MS2 obtido com o "primer" MS2-R5, obteve-se uma curva de dissociação satisfatória, indicando a presença de um produto único na amplificação, mostrando portanto que o conjunto de oligonucleotídeos testados é adequado para a amplificação do CI MS2. Os plots da amplificação estão mostrados na Figura 29 e a curva de dissociação na Figura 30.

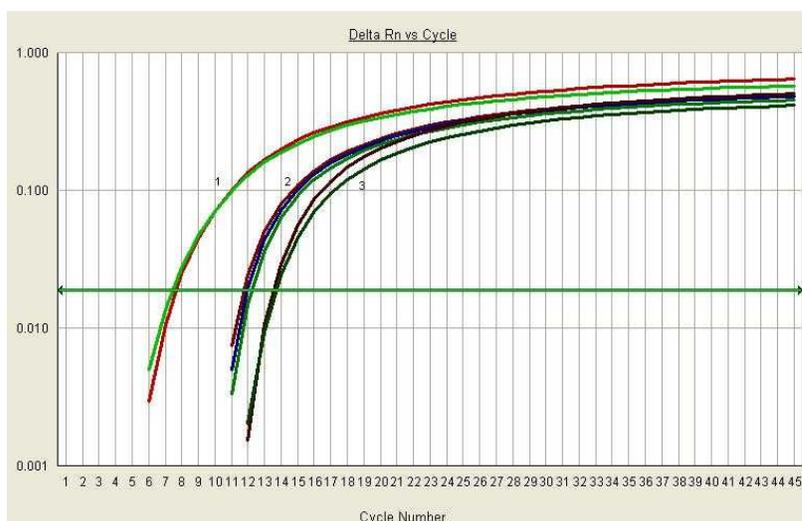


FIGURA 29 - AMPLIFICAÇÃO DO CI MS2 USANDO SYBR®Green.

NOTA: No eixo x estão relacionados os ciclos e no y a fluorescência normalizada;

- 1 - cDNA do CI MS2, com $5,40 \times 10^2$ PFU;
- 2 - cDNA do CI MS2, com $1,35 \times 10^2$ PFU;
- 3 - cDNA do CI MS2, com $3,38 \times 10$ PFU.

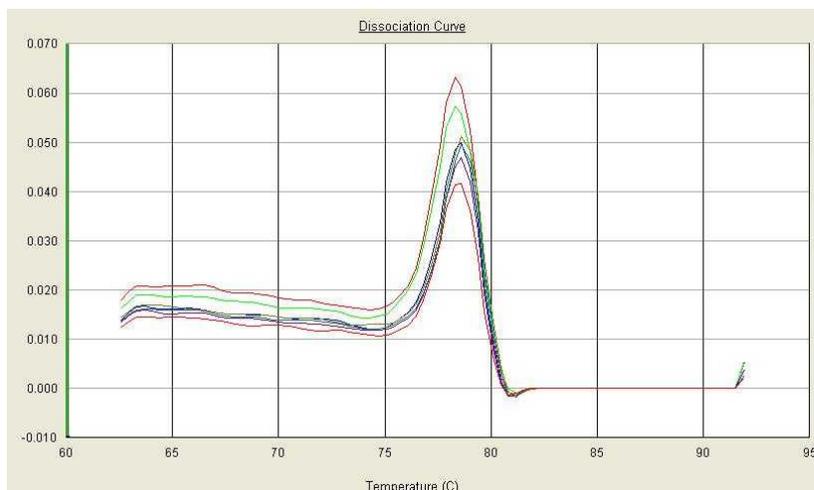


FIGURA 30 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DOS AMPLICONS DO CI MS2

NOTA: Mostrados na Figura 29. No eixo x encontra-se a temperatura e em y os dados derivados da fluorescência em cada temperatura.

4.7.2 Controle Interno MS2 - Amplificação com TaqMan®

Os "primers" MS2-F5 e MS2-R5 foram testados com a tecnologia TaqMan. O objetivo da utilização deste sistema baseado em sondas é de permitir o desenvolvimento posterior do teste multiplex para diferenciar a amplificação do controle interno da amplificação do vírus da hepatite C, em uma técnica qualitativa diagnóstica, utilizando neste caso uma sonda específica para cada sequência objeto de pesquisa. Foram testadas duas concentrações da sonda MS2-S5 1 pmol/ul e 5 pmol/ul, usando o protocolo base no qual colocou-se "primers" 5 picomol/ul e os parâmetros térmicos descrito em material e métodos. Como molde foi usado o cDNA obtido na reação de transcrição reversa feita com o "primer" MS2-R5. A Figura 31 mostra os resultados obtidos utilizando-se estas concentrações de sondas.

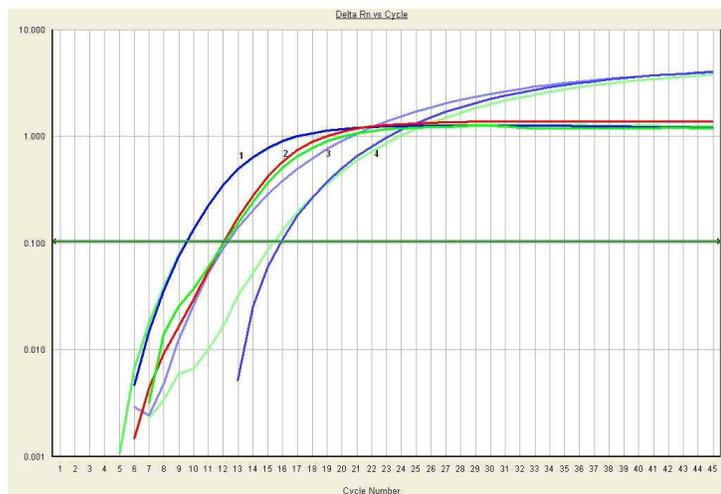


FIGURA 31 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CI MS2 USANDO SONDA

NOTA: 1: CI MS2 com $5,40 \times 10^2$ PFU, na PCR com sonda MS2S5 1 pmol/ul;
 2: CI MS2 com $1,08 \times 10^2$ PFU, na PCR com sonda MS2S5 1 pmol/ul;
 3: CI MS2 com $5,40 \times 10^2$ PFU, na PCR com sonda MS2S5 5 pmol/ul;
 4: CI MS2 com $1,08 \times 10^2$ PFU, na PCR com sonda MS2S5 5 pmo/ul.

Optou-se pela utilização da sonda com concentração 1 pmol/ul, uma vez que a amplificação da amostra com sonda nesta concentração ocorreu 3 C_T (s) antes que quando se utiliza a sonda 5 pmol/ul, aumentando desta forma a eficiência da reação. Além disto, as regiões correspondentes às fases exponenciais das curvas de amplificações das reações mais eficientes (curvas 1 e 2) são retas, o que não ocorre com as curvas 3 e 4. Como consequência, as curvas 1 e 2 têm as regiões exponenciais paralelas, condição essencial para que amostras de concentração diferentes sejam comparadas.

Foram feitas cinco diluições seriadas para o cDNA do MS2, contendo 13,4 PFU, 1,34 PFU, $1,34 \times 10^{-1}$ PFU e $1,34 \times 10^{-2}$ PFU. Estas diluições foram amplificadas na PCR em tempo real. Na Figura 32 pode-se observar a amplificação obtida para as respectivas concentrações de cDNA do CI MS2.

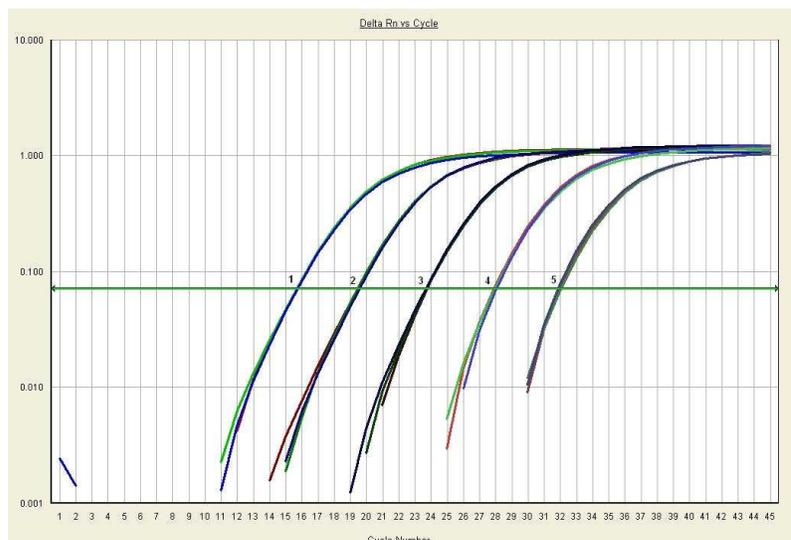


FIGURA 32 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CONTROLE INTERNO MS2

- NOTA: 1: CI MS2 com 13,4 PFU;
 2: CI MS2 com 1,34 PFU;
 3: CI MS2 com $1,34 \times 10^{-1}$ PFU;
 4: CI MS2 com $1,34 \times 10^{-2}$ PFU;
 5: CI MS2 com $1,34 \times 10^{-3}$ PFU.

A utilização de uma diluição seriada como a que foi feita permite que seja definida a eficiência da reação da PCR em questão, que nem sempre é igual a 100%. Na Figura 33, os dados de C_T da reação exibida na Figura 32 foram utilizados para a construção de um gráfico, no qual horizontalmente estão distribuídos em escala logarítmica os valores relativos à concentração do CI MS2 e verticalmente os valores de threshold cycle. (C_T) Este gráfico é fornecido pelo software do equipamento de PCR em tempo real. O “slope” da curva (-3,999), que corresponde ao “a” na equação $y = ax + b$, é utilizado em uma fórmula para o cálculo da eficiência. Calculou-se que a reação ocorreu com uma eficiência igual a 77,9%.

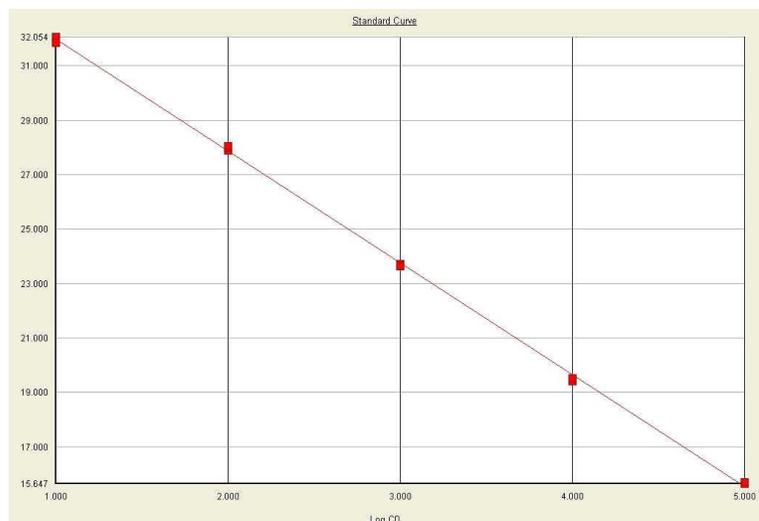


FIGURA 33 - GRÁFICO CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA \times C_T DOS DADOS RELATIVOS DA FIGURA 32

Inicialmente, as otimizações relativas à PCR de CI MS2, tanto no sistema SYBR[®]Green quanto no TaqMan, foram feitas usando o programa de ciclagem de 95°C, 10 minutos, seguidos por 45 ciclos de 95°C, 30 segundos, 50°C, 30 segundos e 72°C durante 1 minuto. No momento da otimização da PCR multiplex do CI MS2 e HCV, alteramos as condições térmicas para: 95°C, 10 minutos, e 45 ciclos de 95°C, 30 segundos e 60°C durante 1 minuto. Nesta ocasião, avaliou-se novamente como seria o desempenho da amplificação do CI MS2 na ausência do HCV, nas duas condições de ciclagem. Testou-se uma amostra de cDNA do CI MS2 com 2×10^2 PFU nas duas condições térmicas, para comparação. O perfil de amplificação destes testes está exibido na Figuras 34 e 35.

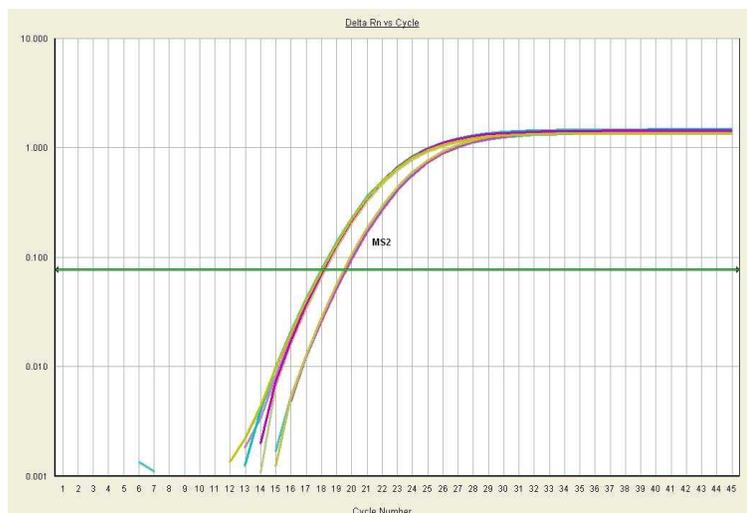


FIGURA 34 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO MS2 COM AS ETAPAS DE ANELAMENTO E EXTENSÃO A 60°C

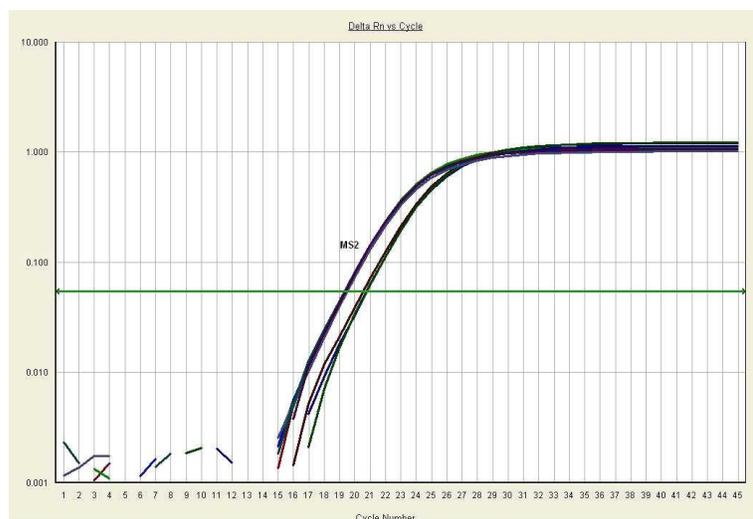


FIGURA 35 - AMPLIFICAÇÃO DO MESMO cDNA DO MS2, COM ANELAMENTO A 50°C E A EXTENSÃO A 72°C

Comparando-se as duas imagens obtidas, percebe-se que os perfis de amplificação usando as duas condições térmicas são muito similares podendo-se utilizar ambos. Observa-se também que, em uma mesma PCR, os cDNA(s), apesar de terem teóricamente a mesma quantidade de PFU(s), exibem C_T diferentes. Isto porque os RNA(s) foram obtidos de uma solução de MS2 estocado a 4°C e a -20°C e em momentos diferentes (discutido adiante).

4.7.3 Controle Interno Competitivo - Amplificação com SYBR®Green

Na amplificação do MS2 recombinante (CIC), avaliou-se dois conjuntos de "primers": HCV-F em combinação com HCV-R2 e HCV-F com HCV-R3. Estes oligonucleotídeos estão localizados na sequência sintética inserida no genoma do MS2 e são os mesmos "primers" usados na amplificação do vírus da hepatite C. O tamanho dos fragmentos gerados pela combinação destes "primers" são 72 bases (quando se usa HCV-R2) e 144 bases (quando se usa HCV-R3). Avaliou-se os dois conjuntos de "primers" com a intenção de substituir o "primer" HCV-R3, com duas degenerações na sequência para que o mesmo fosse efetivo na amplificação de todos os genótipos do HCV, pelo oligo HCV-R2, sem nenhuma degeneração. A PCR foi feita usando como molde o cDNA obtido na transcrição reversa feita com o "primer" HCV-R3 e utilizou-se o protocolo base e as condições térmicas descritas em materiais e métodos. Os gráficos de amplificação e as curvas de dissociação geradas na amplificação com SYBR®Green e com os dois conjuntos de "primers" estão mostradas nas Figuras 36, 37, 38 e 39.



FIGURA 36 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CIC USANDO SYBR®Green E A COMBINAÇÃO DE "PRIMERS" HCV-F e HCV-R2

NOTA: 1: CIC com 1×10^3 PFU eq.;
2: CIC com $0,2 \times 10^3$ PFU eq.

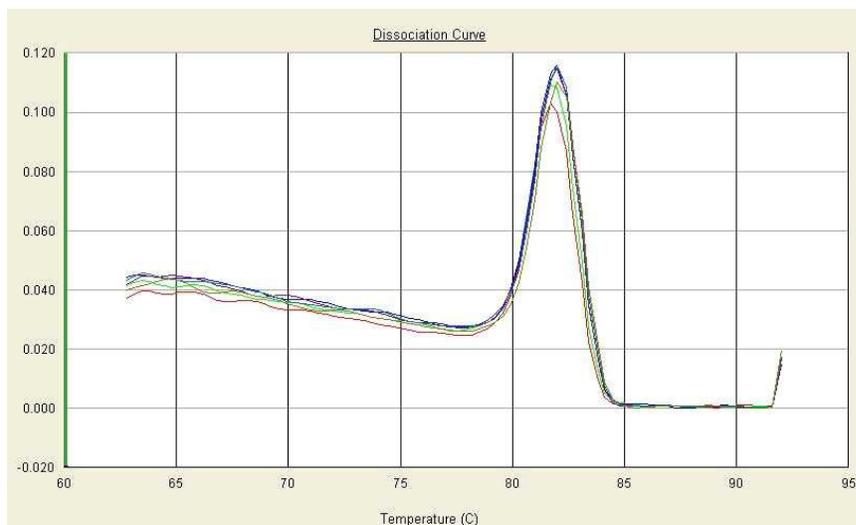


FIGURA 37 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DOS AMPLICONS DO CIC MOSTRADOS NA FIGURA 36



FIGURA 38 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CIC USANDO SYBR®Green E A COMBINAÇÃO DE "PRIMERS" HCV-F e HCV-R3

NOTA: 1: CIC com $1,0 \times 10^3$ PFU eq.;
2: CIC com $0,2 \times 10^3$ PFU eq.

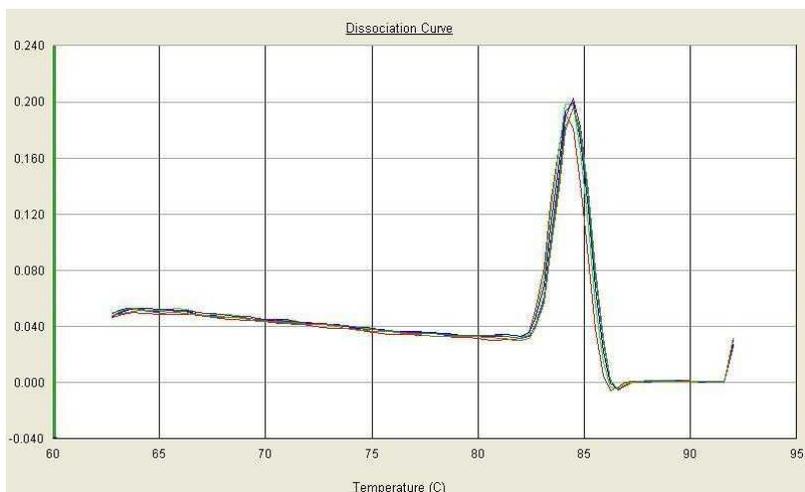


FIGURA 39 - CURVAS DE DISSOCIAÇÃO DOS AMPLICONS DO CIC MOSTRADOS NA FIGURA 38

Não foram observadas ampliações além da esperada para nenhum conjunto de "primers", demonstrando que neste sistema os dois conjuntos têm uma performance similar.

4.7.4 Controle Interno Competitivo - Amplificação com TaqMan®

Os dois conjuntos de oligos HCV-F/HCV-R2 e HCV-F/HCV-R3 foram testados no sistema TaqMan em combinação com a sonda HCV-SCI3 na concentração 1 pmol/ul. A PCR foi feita com o protocolo específico para TaqMan, e utilizou-se o mesmo cDNA e condições descritas no sistema SYBR®Green. Os resultados obtidos nesta reação estão mostrados na Figura 40, na qual pode-se verificar que a amplificação que usou o "primer" reverso HCV-R2 ocorreu 5 C_T (s) antes que com o HCV-R3. Esta relação é mantida entre as ampliações do cDNA com 13,4 PFU eq. e 1,34 PFU eq. como pode-se observar na figura apresentada.

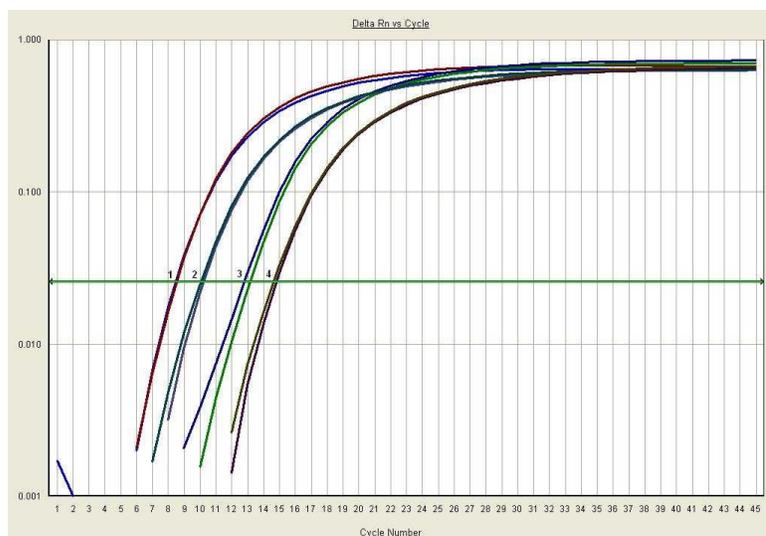


FIGURA 40 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CIC USANDO OS "PRIMERS" HCV-F/HCV-R2 e HCV-F/HCV-R3 E A Sonda HCV-SCI3 1p

NOTA: 1: CIC com 13,4 PFU eq. com HCV-F/HCV-R2 e sonda HCV-SCI3 1picomol/ul;
 2: CIC com 1,34 PFU eq. com HCV-F/HCV-R2 e sonda HCV-SCI3 1picomol/ul;
 3: CIC com 13,4 PFU eq. com HCV-F/HCV-R3 e sonda HCV-SCI3 1picomol/ul;
 4: CIC com 1,34 PFU eq. com HCV-F/HCV-R3 e sonda HCV-SCI3 1picomol/ul.

Com estes resultados efetivou-se a utilização do conjunto de "primers" HCV-F e HCV-R2 na amplificação do CIC nos passos subsequentes do projeto.

Avaliou-se, então, a eficiência da reação utilizando os "primers" HCV-F e HCV-R2 preparando-se diluições seriadas do cDNA do CIC na ordem 10, obtendo-se assim 7 concentrações diferentes de CIC, 20 PFU eq., 2 PFU eq., 2×10^{-1} PFU eq., 2×10^{-2} PFU eq., 2×10^{-3} PFU eq. e 2×10^{-4} PFU eq.

Os resultados obtidos serviram de base para a geração de uma curva padrão. O gráfico de amplificação está mostrado na Figura 41 e a curva padrão obtida, na Figura 42.

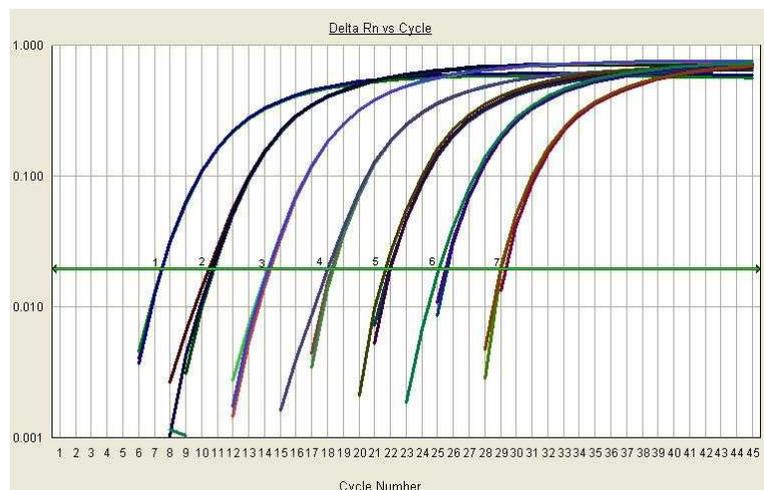


FIGURA 41 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CIC

NOTA: 1: CIC com 2×10^3 PFU eq.;
 2: CIC com 2×10^2 PFU eq.;
 3: CIC com 2×10 PFU eq. ;
 4: CIC com 2 PFU eq.;
 5: CIC com 2×10^{-1} PFU eq.;
 6: CIC com 2×10^{-2} PFU eq.;
 7: CIC com 2×10^{-3} PFU eq.

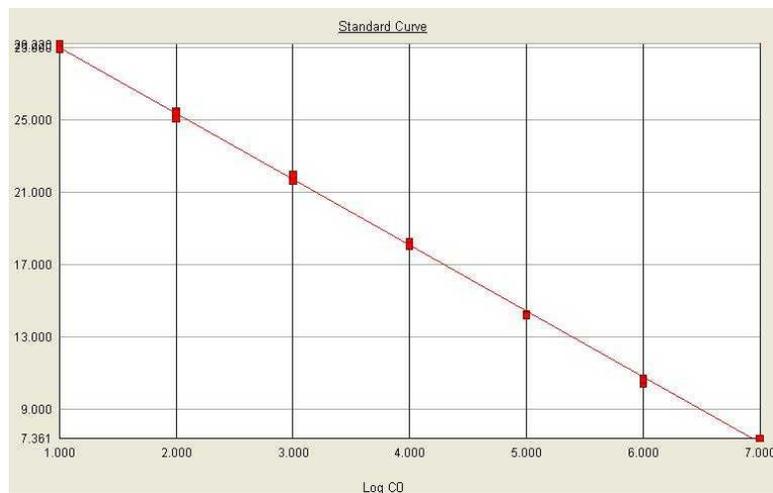


FIGURA 42 - GRÁFICO DA CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA $\times C_T$ DOS DADOS RELATIVOS DA FIGURA 41

A curva padrão obtida apresentou slope ou coeficiente angular igual a -3,65. Com esta informação disponível, pôde-se calcular que a eficiência da amplificação foi igual a 90,54%, ou seja, bastante satisfatória.

4.7.5 HCV - Amplificação com TaqMan®

A amplificação do HCV foi padronizada usando o mesmo conjunto de "primers" HCV-F e HCV-R2, escolhido para o CIC. Estes "primers" estão localizados na região 5' UTR do vírus, que é uma das mais conservadas do seu genoma e seu padrão de amplificação foi avaliado com SYBR®Green no momento em que estudou-se o CIC.

O estudo da reação para o vírus da hepatite C foi feito usando cDNA obtido por transcrição reversa de amostras de pacientes com carga viral quantificada e também com amostras do painel comercial "HCV OptiQuant HCV Viral". O "primer" usado na reação de transcrição reversa foi o HCV-R3, o mesmo otimizado para o CIC.

Os "primers" HCV-F e HCV-R2 foram avaliados no sistema TaqMan, usando a sonda desenhada HCV-S, específica para o HCV. Inicialmente avaliou-se qual seria a melhor concentração de sonda a ser utilizada na reação. Nos testes utilizou-se cDNA de amostra do painel comercial "OptiQuant HCV Viral", contendo 4.300 UI, que foi diluída gerando mais duas amostras com 430 UI e 43 UI respectivamente que foram amplificadas na PCR em tempo real, usando duas concentrações de sonda, 5 pmol/ul e 1 pmol/ul. Esta PCR foi feita a 95°C por 10 minutos, 50°C, 30 segundos, 72°C durante 1 minuto. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 43 onde pode-se observar que os cDNA(s) com 4.300 UI e com 430 UI amplificaram na PCR com a sonda 5 pmol/ul, 1 C_T antes, que com a sonda 1 pmol/ul, enquanto que o c-DNA com 43 UI, amplificou com 2 C_T (s) de diferença. Os C_T mais precoces, aliados à forma da curva, mais retilíneas em sua porção exponencial, indicam que a eficiência da reação está sendo maior com a concentração maior de sonda. Portanto a reação ficou padronizada com a sonda na concentração 5 pmol/ul.

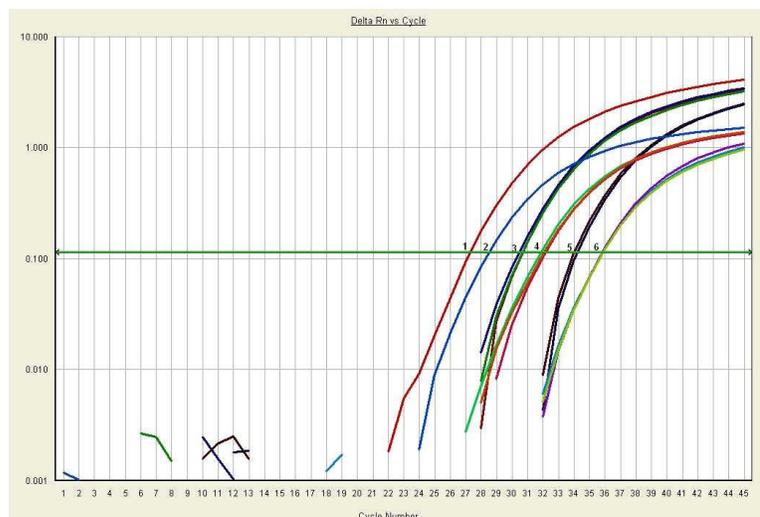


FIGURA 43 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DE TRÊS AMOSTRAS DO PAINEL COMERCIAL "HCV OptiQuant HCV Viral" COM A Sonda HCV-S 5 pmol/ul E 1 pmol/ul

NOTA: 1: 4.300 UI/ reação, sonda HCV-S 5 pmol/ul.;
 2: 4.300 UI/ reação, sonda HCV-S 1 pmol/.;
 3: 430 UI/ reação, sonda HCV-S 5 pmol/ul.;
 4: 430 UI/ reação, sonda HCV-S 1 pmol/ul.;
 5: 43 UI/ reação, sonda HCV-S 5 pmol/ul.;
 6: 43 UI/ reação, sondaHCV-S 1 pmol/ul.

Testou-se também 3 amostras clínicas diagnosticadas com hepatite C e que apresentavam cargas virais 682.000 UI/ml, 180.000 UI/ml e 1.270 UI/ml, e amostras do painel Optiquant. Utilizou-se o protocolo base e a sonda com concentração 5 pmol/ul. Os resultados para estas amostras estão mostrados na Figura 44 e para as amostras do painel na Figura 45, onde pode-se observar que as amplificações ocorreram dentro de uma escala de valores que equivalem às concentrações das amostras estudadas indicando que a padronização da reação foi satisfatória. As UI descritas na Figura 44 foram calculadas para 5 ul de cDNA colocado na placa de reação.

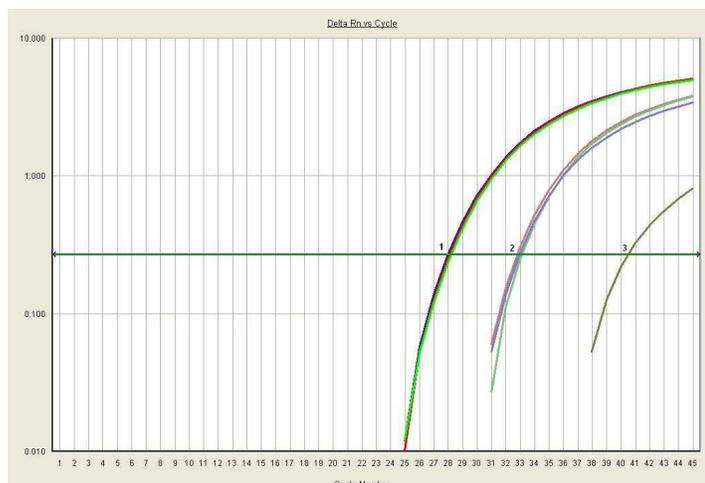


FIGURA 44 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO OBTIDAS PARA AS AMOSTRAS DE HCV

NOTA: 1: HCV com 4,692 UI;
 2: HCV com 1,239 UI;
 3: HCV com 10,9 UI/.

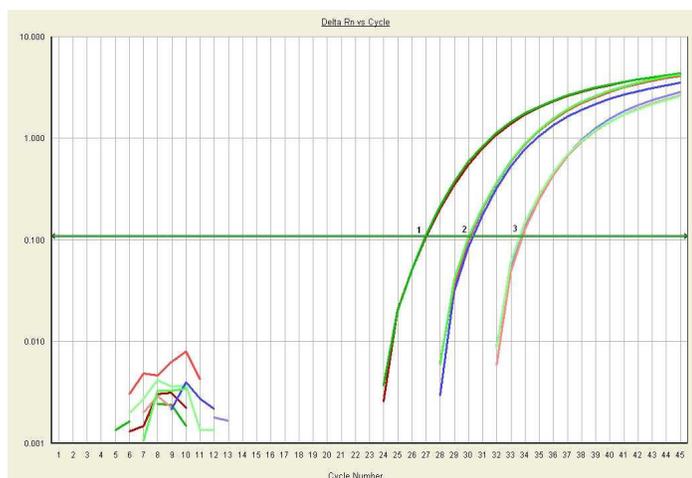


FIGURA 45 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DO PAINEL OPTIQUANT

NOTA: 1: Amostra com 4.300 UI.;
 2: Amostra com 430 UI.;
 3: Amostra com 43 UI.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO CONTROLE INTERNO COMPETITIVO

A quantificação de um controle interno antes de usar nos testes de PCR é essencial. Conhecendo-se a concentração pode-se padronizar a quantidade de CI a ser adicionada à amostra clínica já no processo da extração e pode-se definir

previamente o resultado a ser obtido no momento da utilização do mesmo em uma técnica diagnóstica. Além disto é possível a preparação de alíquotas prontas, com concentrações conhecidas que podem ser estocadas em condições também definidas, por vários meses até o momento do uso.

O CI MS2 titulado com $2,0 \times 10^6$ PFU/ml foi usado como padrão na quantificação do CIC. Este padrão foi gerado extraindo-se o RNA presente em 28×10^3 PFU do MS2, e obtendo-se o cDNA na transcrição reversa a partir de $4,01 \times 10^3$ PFU, com MS2-R5, que após a purificação foi colocado em 25 ul de meio SM. Este cDNA foi usado para gerar a curva de quantificação. Preparou-se diluição seriada na ordem 10. Foram feitas 8 diluições, contendo diferentes quantidades de PFU. A Tabela 7, mostra o número de PFU nas diluições preparadas e o número de PFU, presente em 5 ul de cada uma das diluições que foram colocadas na reação de PCR em tempo real.

TABELA 7 - PFU DO PADRÃO (CI-MS2) USADO NA QUANTIFICAÇÃO DO CIC

Diluição	PFU nas Diluições (50 ul)	PFU /PCR (5ul)
1×10^{-1}	$8,02 \times 10^{-2}$	$8,02 \times 10^{-1}$
1×10^{-2}	$8,02 \times 10^{-1}$	8,02
1×10^{-3}	8,02	$8,02 \times 10^{-1}$
1×10^{-4}	$8,02 \times 10^{-1}$	$8,02 \times 10^{-2}$
1×10^{-5}	$8,02 \times 10^{-2}$	$8,02 \times 10^{-3}$
1×10^{-6}	$8,02 \times 10^{-3}$	$8,02 \times 10^{-4}$
1×10^{-7}	$8,02 \times 10^{-4}$	$8,02 \times 10^{-5}$
1×10^{-8}	$8,02 \times 10^{-5}$	$8,02 \times 10^{-6}$

NOTA: ^a As diluições foram preparadas em 50 ul
^b colocou-se 5 ul de cDNA na PCR

Com os resultados das amplificações das diluições de cDNA foi possível obter-se uma curva padrão com oito pontos distintos. O gráfico de amplificação está mostrado na Figura 46 e a curva obtida na Figura 47.

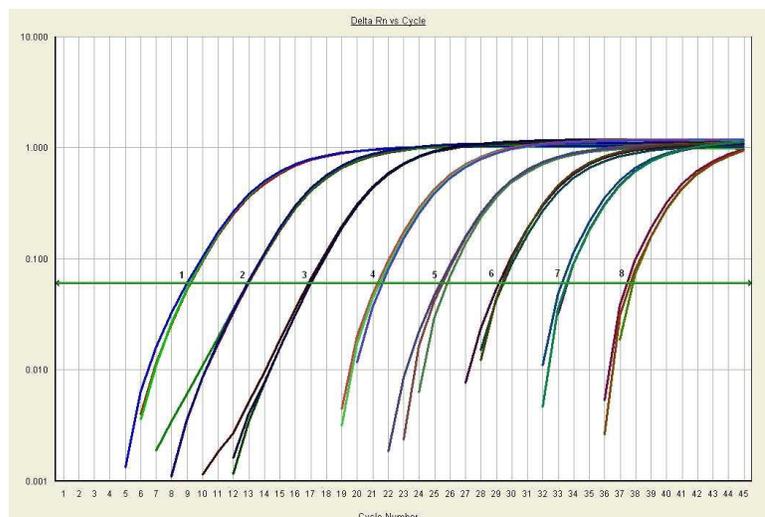


FIGURA 46 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CI MS2 USADA NA QUANTIFICAÇÃO DO CIC

NOTA: 1: CI MS2 com 80,2 PFU;
 2: CI MS2 com 8,02 PFU;
 3: CI MS2 com $8,02 \times 10^{-1}$ PFU;
 4: CI MS2 com $8,02 \times 10^{-2}$ PFU;
 5: CI MS2 com $8,02 \times 10^{-3}$ PFU;
 6: CI MS2 com $8,02 \times 10^{-4}$ PFU;
 7: CI MS2 com $8,02 \times 10^{-5}$ PFU;
 8: CI MS2 com $8,02 \times 10^{-6}$ PFU.

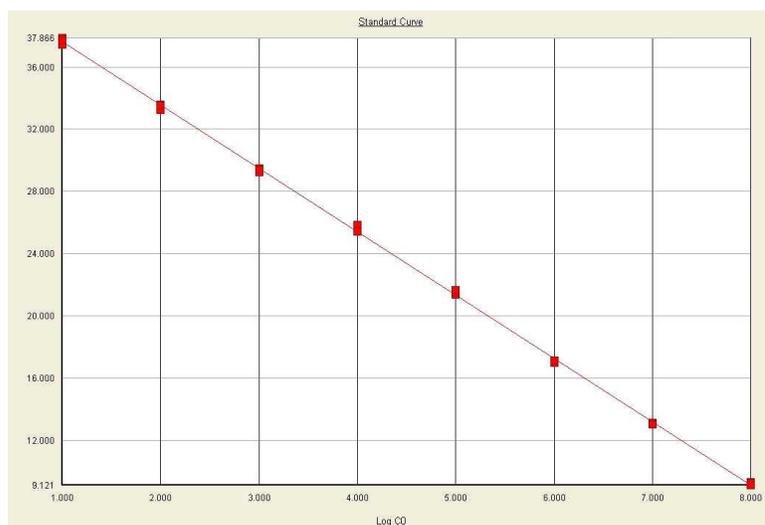


FIGURA 47 - GRÁFICO CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA \times C_T DOS DADOS RELATIVOS DA FIGURA 46

Na mesma placa de PCR em tempo real em que foi feita a curva colocou-se cDNA do CIC e do CI MS2 para ser quantificado em relação a amplificação do padrão preparado.

Estes cDNA(s) resultaram de triplicatas de extração do RNA tanto do CIC quanto do CI MS2, obtidos em 3 momentos diferentes, porém em cada momento trabalhou-se com uma amostra de CIC e uma de CI MS2. As 6 amostras foram amplificadas na mesma reação usando os mesmos "primers" e as mesmas condições. A eficiência da reação calculada foi igual a 77,9%.

Usando a curva padrão gerada o software estabeleceu quantidades para cada um dos cDNA amplificados na reação. Estes valores estão mostrados na Tabela 8.

TABELA 8 - DADOS OBTIDOS NA QUANTIFICAÇÃO DO CIC EM RELAÇÃO AO CI MS2

Controle Interno	Quantidade Média/Curva	Relação CIC/CI MS2	Resultado
CIC - 1	17,8 ⁺¹¹	17,8 ⁺¹¹ /7,72 ⁺¹¹	2,31
CIC - 2	7,69 ⁺¹¹	7,69 ⁺¹¹ / 2,90 ⁺¹¹	2,65
CIC - 3	15,6 ⁺¹¹	1,56 ⁺¹¹ /6,40 ⁺¹¹	2,44
MS2 -1	7,72 ⁺¹¹		
MS2 -2	2,90 ⁺¹¹		
MS2- 3	6,40 ⁺¹¹		

Para quantificar o CIC em relação ao MS2, correlacionou-se o valor obtido para o CIC na extração nº 1 com o valor obtido para o CI MS2 na extração nº 1, feita simultaneamente. O mesmo foi feito com as extrações 2 e 3 dos dois controles. A média destas 3 razões foi igual a 2,5 indicando que a solução estoque de controle de CIC está 2,5X mais concentrada, em termos de alvo na PCR, que está a do MS2 com 2×10^6 PFU/ml.

Como o CIC não produz placas de lise adotamos a unidade equivalentes de PFU para compararmos com o CI MS2. Abreviamos esta unidade por PFU eq. no

decorrer do documento. Pudemos então determinar que nossa solução de controle interno tinha 5×10^6 PFU eq./ml.

4.9 IMPLEMENTAÇÃO DO USO DO CIC EM FORMATO "TWO STEP"

O objetivo deste trabalho era implementar um teste de PCR em tempo real para o vírus da hepatite C, no qual o controle interno seria adicionado às amostras clínicas. O RNA dos dois vírus seriam recuperados no processo de extração de ácidos nucleicos e amplificado em um multiplex sendo neste distinguidos por meio da utilização de sondas específicas.

Para tanto, avaliamos, em um primeiro momento, como a amplificação de 2 alvos diferentes em uma mesma reação poderia interferir na performance da detecção tanto de um quanto de outro. Estes testes iniciais foram feitos extraíndo-se RNA do HCV e do CI separadamente, sintetizando o cDNA também separadamente e então misturando o cDNA de ambos na PCR. Em um segundo momento, com as quantidades melhor definidas, procedeu-se aos testes da mistura dos 2 vírus antes da extração do RNA.

O controle interno competitivo foi construído de forma a ser amplificado pelo mesmo par de "primers" utilizado para o vírus da hepatite C, HCV-F e HCV-R2, e diferenciado do mesmo pelo uso da sonda HCV-SCI3 desenhada para esse controle, sendo, desta forma, um controle competitivo. Por isso foi necessário estabelecer um equilíbrio entre os diversos componentes da reação, evitando-se assim a inibição da amplificação do controle ou do HCV. Neste sentido, avaliou-se cuidadosamente a quantidade de CI a ser adicionada às amostras clínicas, a concentração de cada um dos componentes da reação, e também os parâmetros cíclicos usados, observando-se sempre os efeitos do sinal do controle interno na amplificação do HCV.

Padronizamos também a utilização do CI MS2, um controle não competitivo, que após a extração, foi amplificado na PCR multiplex contendo "primers" MS2-F5 e MS2-R5, para as sequências do bacteriófago e "primers" para o HCV, HCV-F e o HCV-R2. Além disto foi incluída na reação as sondas para o HCV (HCV-S) e para o MS2 (MS2-S5). As mesmas avaliações conduzidas para o controle interno competitivo foram feitas para o controle interno não competitivo.

4.9.1 PCR Multiplex "Two Step" com o Controle Interno Competitivo

Inicialmente testou-se como seria a performance da PCR em tempo real multiplex misturando-se cDNA do CIC e cDNA de HCV proveniente de três amostras de hepatite C com cargas virais 682.000 UI/ml, 180.000 UI/ml e 1.270 UI/ml. Testou-se cada uma destas amostras com um cDNA do CIC contendo $0,100 \times 10^6$ PFU eq. e duas concentrações produzidas diluindo-se este c-DNA e contendo $0,100 \times 10^3$ e $0,100$ PFU eq. de CIC. Destas preparações utilizou-se 10^4 PFU eq./10 ul, 10 PFU eq./10 ul e 0,01 PFU eq./10 ul. Cada uma destas concentrações foi misturada ao cDNA do HCV com 2.346,06 UI/10 ul, 619,20 UI/10 ul, e com 4,36 UI/10 ul. Obteve-se 20 ul de cada mistura. As amostras preparadas foram amplificadas na PCR em tempo real para o HCV.

A imagem da Figura 48, mostra o padrão de amplificação para o cDNA do CIC obtidas para $0,100 \times 10^6$ PFU eq, $0,100 \times 10^3$ e $0,100$ PFU eq não misturadas com amostra de HCV. As concentrações $0,500 \times 10^4$ PFU eq., 5 PFU eq., e 5×10^{-3} PFU eq. mostradas na figura foram calculadas para 5 ul de cDNA colocados nos poços da placa de PCR.

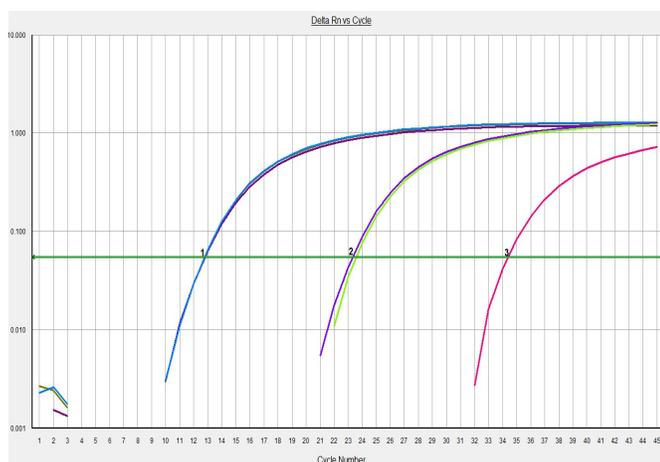


FIGURA 48 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO CIC SEM A ADIÇÃO DO HCV

NOTA: 1: CIC com $0,500 \times 10^4$ PFU eq.;
 2: CIC com 5 PFU eq.;
 3: CIC com 5×10^{-3} PFU eq.

A Figura 49, apresenta a amplificação obtida para o cDNA das amostras de hepatite C testadas, sem a adição de controle interno. Pode-se observar que as amplificações ocorreram em C_T s, distintos e estão de acordo com a carga viral das amostras determinadas usando produto comercial. A amostra de HCV com carga viral 682.000 UI/ml amplificou no C_T 28, a amostra com carga viral 180.000 UI/ml, foi obtida no C_T 33 e a amostra com 1.270 UI/ml amplificou no C_T 41. As cargas virais mostradas na figura referem-se à quantidade de HCV, presente em 5 ul de cDNA, colocados na placa de reação.



FIGURA 49 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE HCV, SEM A ADIÇÃO DO CIC

NOTA: 1: HCV com carga viral 1.173,04 UI;
 2: HCV com carga viral 309,6UI;
 3: HCV com carga viral 2,18 UI.

A Figura 50, mostra os resultados da PCR multiplex para o CI e para a amostra de HCV com carga viral 682.000 UI/ml. Analisando-se as imagens obtidas juntamente com os relatórios gerados pelo programa pode-se concluir que quando misturou-se 2.346,06 UI de HCV e o CIC com 10^4 PFU eq o HCV não amplificou. O CIC foi obtido no C_T 14. Quando adicionou-se 10 PFU eq. de CIC à mesma concentração de HCV o CI amplificou no C_T 24 e o HCV no C_T 27 e na presença de 0.01 PFU eq., a amplificação do CIC foi obtida no C_T 36 e a do HCV nos C_T (s) 27 e 28. Portanto a duas quantidades de CIC testadas não afetaram a amplificação da amostra de HCV testada que na PCR "singleplex" foi obtida no mesmo C_T .conforme pode-se observar na Figura 49. As concentrações apresentadas nas legendas das

figuras foram calculadas para 5 ul de cDNA proveniente da mistura CIC + HCV preparada.

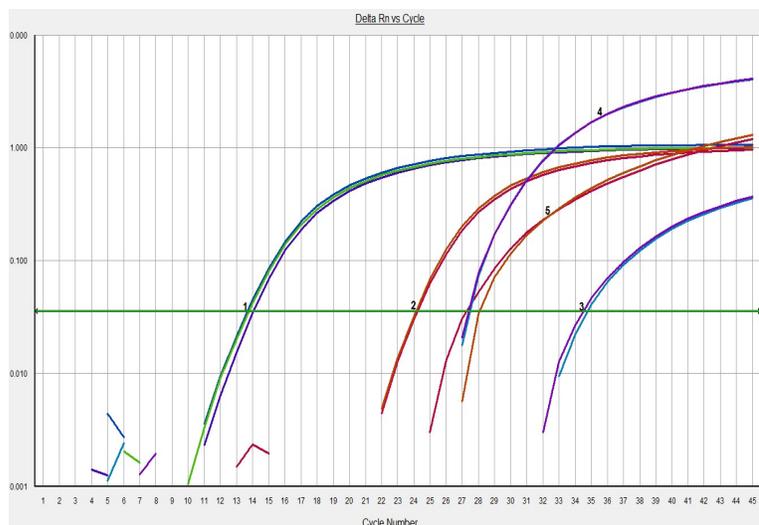


FIGURA 50 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES DE HCV (CARGA VIRAL 682.000 UI/ml) COM O CIC

NOTA: 1: CIC com $2,5 \times 10^3$ PFU eq.;
 2: CIC com 2,5 PFU eq.;
 3: CIC com $2,5 \times 10^{-3}$ PFU eq.;
 4: HCV da combinação com 2,5 PFU eq.do CIC;
 5: HCV da combinação com $2,5 \times 10^{-3}$ PFU eq.do CIC.

A Figura 51 apresenta os resultados do multiplex para o CIC e para a amostra de HCV com 180.000 UI. A imagem mostra que quando adicionou-se 10^4 PFU eq./10 ul de CIC e 10 PFU eq./10 ul respectivamente em 610,20 UI/10 ul de HCV não obteve-se amplificação das 154,8 UI do HCV presentes nos 5 ul da mistura de cDNA colocado na microplaca, enquanto que o CIC amplificou nos C_{Ts} 14 e 25. Porém frente a uma concentração menor desse controle, 0,01 PFU eq. adicionada a mesma concentração de HCV este foi amplificado no $C_T = 32$, ou seja 1 C_T à frente do obtido para o HCV sem o CIC que amplificou no $C_T = 33$ (Figura 49), enquanto que o CIC foi obtido no $C_T = 35$.

No multiplex com o controle interno a amostra com 1.270 UI/ml, não amplificou em nenhuma das três combinações enquanto que o controle interno das mesmas amplificou respectivamente nos C_{Ts} 15, 25 e 36 ou seja em C_{Ts} muito próximos aos obtidos para o CIC em plasma (Figura 48).

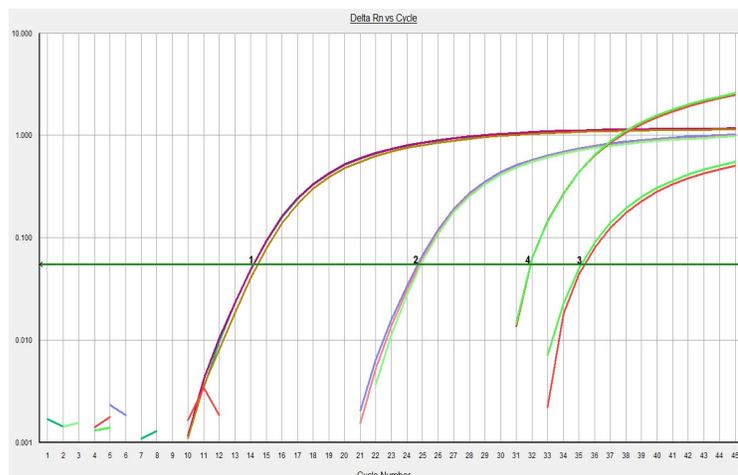


FIGURA 51 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES DO HCV (CARGA VIRAL 180.000 UI/ml) COM O CIC

NOTA: 1: CIC com $2,5 \times 10^3$ PFU eq.;
 2: CIC com 2,5 PFU eq.;
 3: CIC com $2,5 \times 10^{-3}$ PFU eq.;
 4: HCV com 154,8 UI da combinação com $2,5 \times 10^{-3}$ PFU.eq.

Estes dados obtidos estão sumarizados na Tabela 9 e mostram claramente a influência da concentração do CI na performance da PCR em tempo real e que essa concentração está diretamente relacionada com a carga viral da amostra. A medida que diminui a carga viral do HCV, deve-se diminuir o número de partículas do controle interno a ser adicionada à amostra clínica até que seja obtido um nível ótimo, que não interfira na amplificação do HCV. No teste realizado a amostra de HCV com carga viral 1.270 UI/ml não amplificou nem mesmo na preparação contendo 0,01 PFU eq. do CIC, sugerindo que a utilização de concentrações menores do controle podem oferecer melhores resultados.

TABELA 9 - C_{Ts} DE AMPLIFICAÇÕES INDIVIDUAIS DE CIC E DO HCV E PARA COMBINAÇÕES CIC/HCV

Amostra	C _T CIC	C _T HCV Carga Viral 682.000 UI/ml	C _T HCV Carga Viral 180.000 UI/ml	C _T HCV Carga Viral 1.270 UI/ml
CIC com 0,100 x 10 ⁶ PFU eq./100 ul ^a	13	x	x	x
CIC com 0,100 x 10 ³ PFU eq./100 ul	24	x	x	x
CIC com 0,100 PFU eq./100ul	34	x	x	x
HCV com 682.000 UI/ml ^b	x	28	x	x
HCV com 180.000 UI/ml	x	x	33	x
HCV com 1.270 UI/ml	x	x	x	41
HCV+ CIC (2.346,06 UI + 10 ⁴ PFU eq.) ^c	14	não amplificou	x	x
HCV+ CIC (2.346,06 UI + 10 PFU eq.)	24	27	x	x
HCV+ CIC (2.346,06 UI + 0,01 PFU eq.)	35	27 e 28	x	x
HCV+ CIC (619,20 UI + 10 ⁴ PFU eq.)	14	x	não amplificou	x
HCV+ CIC (619,20 UI + 10 PFU eq.)	25	x	não amplificou	x
HCV+ CIC (619,20 UI + 0,01 PFU eq.)	35	x	32	x
HCV+ CIC (4,36 UI + 10 ⁴ PFU eq)	15	x	x	não amplificou
HCV+ CIC (4,36 UI + 10 PFU eq)	25	x	x	não amplificou
HCV+ CIC (4,36 UI + 0,01 PFU eq.)	36	x	x	não amplificou

NOTA: ^a concentrações do c-DNA do CIC e das diluições preparadas

^b concentração das amostras de HCV estudadas

^c concentração das combinações preparadas

Os C_{Ts} apresentados referem-se aos 5 ul colocados nos poços de reação.

Em um segundo momento, avaliou-se a performance do CIC adicionado a amostra clínica antes do processo de extração. Testou-se 6 quantidades diferentes, $2,5 \times 10^{-2}$, $2,5 \times 10^{-3}$, $2,5 \times 10^{-4}$, $2,5 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-6}$ e $2,5 \times 10^{-7}$ PFU eq. Colocou-se individualmente 5 ul do CIC contendo as respectivas quantidades em 195 ul de amostra de HCV com carga viral 86.200 UI/ml. Simultaneamente foram feitas outras duas preparações, 5 ul do CIC contendo $2,5 \times 10^{-2}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ PFU eq. em 195 ul de plasma humano negativo. A partir destas preparações foi feita a extração do RNA do controle interno e do RNA do HCV. O número de PFU eq. do CIC presente nas diluições, nas combinações HCV/CIC antes e após a extração do RNA, bem como a quantidade de PFU eq. das combinações colocadas na PCR estão apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 - PFU eq. DO CIC NAS DILUIÇÕES E NAS COMBINAÇÕES CIC + HCV

Diluição CIC	^a PFU eq.CIC nas diluições preparadas	^b PFU eq. na Amostra HCV + CIC	PFU eq. Pós Extração RNA CIC +HCV	^c PFU eq. na PCR
1×10^{-6}	3	$2,5 \times 10^{-2}$	$0,36 \times 10^{-2}$	$1,8 \times 10^{-4}$
1×10^{-7}	3×10^{-1}	$2,5 \times 10^{-3}$	$0,36 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^{-5}$
1×10^{-8}	3×10^2	$2,5 \times 10^{-4}$	$0,36 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-6}$
1×10^{-9}	3×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-5}$	$0,36 \times 10^{-5}$	$1,8 \times 10^{-7}$
1×10^{-10}	3×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-6}$	$0,36 \times 10^{-6}$	$1,8 \times 10^{-8}$
1×10^{-11}	3×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-7}$	$0,36 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-9}$

NOTA: ^a As diluições do CIC foram preparadas em 600 ul
^b PFU eq. em 5 ul de CIC +195 ul de amostra de HCV
^c PFU eq. em 5 ul

Os RNA(s) obtidos das combinações foram transcritos com o "primer" HCV-R3 e amplificados, sendo distinguidos usando-se as sondas específicas HCV-S e HCV-SCI3. Portanto todos os RNA(s) estiveram sob a influência dos mesmos fatores que interferiram negativamente ou positivamente nos resultados finais.

A Figura 52 mostra as amplificações obtidas para as preparações em que $2,5 \times 10^{-2}$ e $2,5 \times 10^{-4}$ PFU eq. de CIC foram colocadas em 195 ul de plasma negativo e amplificaram respectivamente nos C_{Ts} 30 e 35 e correspondem a $1,8 \times 10^{-4}$ PFU eq. e $1,8 \times 10^{-6}$ PFU eq. concentrações estas presentes em 5 ul de cDNA colocados na placa de PCR. Somente com o objetivo de controlar o processo amplificou-se na mesma reação cDNA proveniente da extração de 200 ul de solução de CIC contendo 1 PFU eq. e de 0,1 PFU eq. Os resultados destas amplificações estão mostrados na Figura 53 e ocorreram no C_T 23 e no C_T 28 respectivamente e correspondem a $7,5 \times 10^{-3}$ PFU eq./reação e a $7,5 \times 10^{-5}$ PFU eq./reação. Estes testes foram feitos para avaliar-se a performance da amplificação do CIC na ausência do HCV.

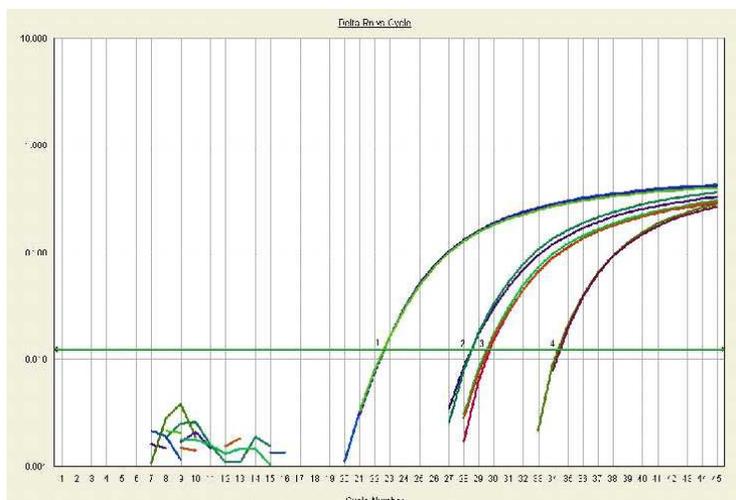


FIGURA 52 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES CIC/PLASMA

NOTA: 1: CIC com $7,5 \times 10^{-3}$ PFU eq.;
 2: CIC com $7,5 \times 10^{-5}$ PFU eq.;
 3: CIC com $1,8 \times 10^{-4}$ PFU eq.;
 4: CIC com $1,8 \times 10^{-6}$ PFU eq.

A Figura 53 mostra a amplificação para as combinações CIC/HCV. Na análise do multiplex para os cDNA(s) observa-se, conforme o esperado, valores decrescentes de C_T para o CIC. Obteve-se C_T 29, 34, 40 e 42 para as $1,8 \times 10^{-4}$, $1,8 \times 10^{-5}$, $1,8 \times 10^{-6}$ e $1,8 \times 10^{-7}$ PFU eq., colocadas respectivamente na placa de PCR.

Portanto à medida que as diluições do controle aumentaram diminuiu o número de PFU eq. ou seja o número de partículas virais presentes na amostra, e consequentemente a quantidade de material amplificado.

Portanto amplificação foi observada até a concentração $1,8 \times 10^{-7}$ PFU eq. A partir desta, o controle interno não foi mais detectado. Valores ótimos foram obtidos até a concentração $1,8 \times 10^{-5}$. O material referente ao HCV contendo 120,46 UI/5 ul provenientes das diferentes combinações HCV/CIC, amplificaram todos sem excessão no C_T 27, demonstrando que nenhuma concentração do controle interno influenciou na amplificação do HCV.

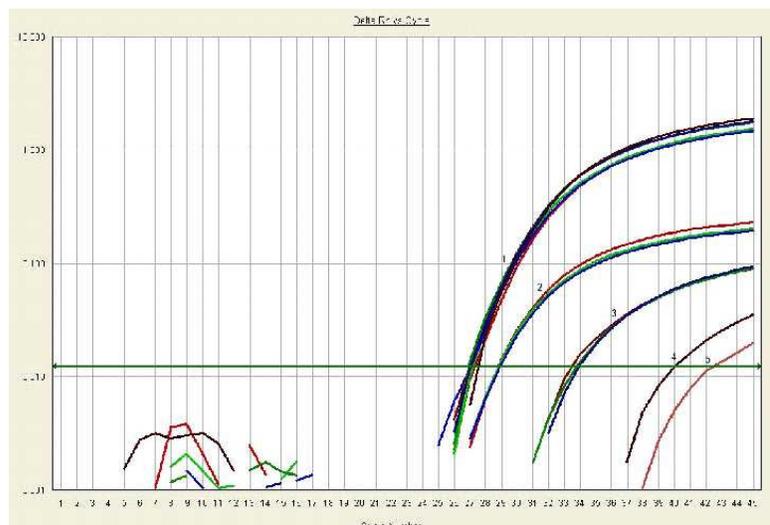


FIGURA 53 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES CIC + HCV

NOTA: 1: HCV com 120,6 UI;
 2: CIC com $1,8 \times 10^{-4}$ PFU eq.;
 3: CIC com $1,8 \times 10^{-5}$ PFU eq.;
 4: CIC com $1,8 \times 10^{-6}$ PFU eq.;
 5: CIC com $1,8 \times 10^{-7}$ PFU eq.

Comparando-se os resultados obtidos para as amplificações do cDNA do CIC transcrito a partir de RNA extraído de uma preparação contendo 5 ul de CIC com $2,5 \times 10^{-2}$ PFU eq. e 195 ul de plasma (Figura 52) com a amplificação referente a extração da mesma quantidade de PFU eq. em 195 ul de HCV, observa-se 1 C_T de diferença, 30 e 29 respectivamente. No entanto, para diluições maiores do CIC estes valores variam. O cDNA com $2,5 \times 10^{-4}$ PFU eq. de CIC em plasma amplificou no C_T 35 (Figura 52), enquanto que a mesma concentração de CIC em combinação com o HCV foi obtido no C_T 40.

Desta forma concluímos, com os dados obtidos que a adição de 5 ul de CIC contendo $2,5 \times 10^{-2}$ PFU eq. ou $2,5 \times 10^{-3}$ PFU eq. em 195 ul de amostra de HCV parecem ser adequadas para uso na técnica diagnóstica testada. O CIC pode ser detectado satisfatoriamente, sem alterar o valor da carga viral da amostra de hepatite C testada. Entretanto outros testes foram necessários com o objetivo de estabelecer a interferência destas concentrações de CIC em amostras com cargas virais mais baixas.

4.9.2 Avaliação Preliminar do Limite de Detecção da Técnica Multiplex com a Presença do Controle Interno Competitivo

Para estabelecer o limite de detecção da técnica de PCR em tempo real para o HCV com o CIC, estudou-se os resultados produzidos pela adição individual de $2,5 \times 10^{-2}$ PFU eq. e $2,5 \times 10^{-3}$ PFU eq. em 195 ul de amostras de HCV. Estas amostras já haviam sido estudadas em outros experimentos, e o volume disponível não era suficiente para os ensaios projetados. Por isso adicionou-se 200 ul de plasma negativo em 800 ul das amostras com carga viral 682.000 UI/ml e 180.000 UI/ml. A carga viral foi então recalculada. As amostras ficaram respectivamente com 545.600 UI/ml e 144.000 UI/ml. A amostra com carga viral 1.270 UI/ml, foi usada pura. Na Tabela 11 constam as cargas virais do HCV e as PFU eq. do CIC nas combinações HCV/CIC preparadas.

TABELA 11 - CARGA VIRAL E PFU eq. NAS COMBINAÇÕES HCV+CIC

Amostra	Carga viral na Comb. HCV +CIC ^a	PFU eq. do CIC na Comb. HCV+CIC ^b
HCV (545.600 UI/ml)	106.392	$2,5 \times 10^{-2}$
HCV (545.600 UI/ml)	106.392	$2,5 \times 10^{-3}$
HCV (144.000 UI/ml)	28.080	$2,5 \times 10^{-2}$
HCV (144.000 UI/ml)	28.080	$2,5 \times 10^{-3}$
HCV (1.270 UI/ml)	247,5	$2,5 \times 10^{-2}$
HCV (1.270 UI/ml)	247,5	$2,5 \times 10^{-3}$

NOTA: ^a carga viral do HCV em 200 ul da combinação HCV/CIC;

^b PFU eq. em 200 ul da combinação HCV/CIC.

Obeve-se RNA(s) usando as amostras preparadas. Esses RNA(s) foram concentrados conforme descrito no Item 3.22.1.

A Tabela 12 mostra o número de PFU nas amostras em cada um dos procedimentos realizados, até o momento da PCR em tempo real. Na Tabela 13 estão mostradas as cargas virais das amostras de HCV, durante todos os procedimentos realizados.

TABELA 12 - PFU eq. DO CIC DA EXTRAÇÃO À PCR EM TEMPO REAL

CIC - $5,0 \times 10^6$ PFU eq./ml	CIC dil 1×10^{-6}	CIC dil 1×10^{-7}
PFU - em 5 ul da diluição de CIC preparada	$2,50 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-3}$
PFU - na combinação HCV/CIC (195 ul HCV + 5 ul CIC)	$2,50 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-3}$
PFU - pós extração/RNA do HCV/CIC e eluição em 60 ul	$2,50 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-3}$
PFU - RNA concentrado para 10 ul	$2,50 \times 10^{-2}$	$2,5 \times 10^{-3}$
PFU - RT com 8.6 ul de RNA	$2,15 \times 10^{-2}$	$2,15 \times 10^{-3}$
PFU - pós Microcon , volume 100 ul (dividido em 25 e 75 ul)	$2,15 \times 10^{-2}$	$2,15 \times 10^{-3}$
PFU - volume 25 ul - fração A	$5,40 \times 10^{-3}$	$5,40 \times 10^{-4}$
PFU - 75 ul concentrada com Microcon para 20 ul - fração B	$1,62 \times 10^{-2}$	$1,62 \times 10^{-3}$
PFU - PCR com cDNA pós microcon em 100 ul	$1,07 \times 10^{-3}$	$1,07 \times 10^{-4}$
PFU - PCR do cDNA da fração A	$1,08 \times 10^{-3}$	$1,08 \times 10^{-4}$
PFU - PCR do cDNA da fração B	$4,05 \times 10^{-3}$	$4,05 \times 10^{-3}$

TABELA 13 - CARGAS VIRAIS DO HCV DA EXTRAÇÃO À PCR EM TEMPO REAL

Amostra	HCV-1 UI	HCV-2 UI	HCV-3 UI
Carga viral em UI/ml (CV em UI)	545.600	144.000	1.270 UI
CV - em 195 ul usado na extração do RNA do HCV	106.392	28.080	248 UI
CV - pós extração do RNA eluído em 60 ul	106.392	28.080	248 UI
CV - RNA concentrado para 10 ul	106.392	28.080	248 UI
CV - RT com 8.6 ul de RNA	91.497	24.149	213 UI
CV - após Microcon, volume de 100 ul (dividido em 25 ul e 75 ul)	91.497	24.149	213 UI
CV - volume 25 ul - fração A	x	x	53 UI
CV - 75 ul concentrado com Microcon para 20 ul	x	x	160 UI
CV - PCR	4.574 UI	1.207 UI	A = 11 UI e B = 40 UI

Os resultados da PCR em tempo real obtidos para a amostra do HCV com 545.600 UI/ml estão apresentados na Figura 54, onde pode-se observar que a amplificação de 4.574 UI do vírus HCV ocorreu no C_T 24 em ambas as extrações, independente da concentração do CIC adicionado na amostra clínica. Por outro lado o CIC com $1,07 \times 10^{-3}$ PFU eq. e com $1,07 \times 10^{-4}$ PFU eq. presentes nos 5 ul de

cDNA colocados na placa de PCR, amplificaram nos C_T 30 e 39 respectivamente, confirmando os testes feitos anteriormente que demonstraram que estes valores de PFU eq. testadas podem ser usadas sem interferir na amplificação de amostras com carga viral alta, como a da amostra testada.



FIGURA 54 - CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES HCV (545.600 UI/ml) COM O CIC

NOTA: 1: HCV com 4.574 UI
 2: CIC com $1,07 \times 10^{-3}$ PFU eq.;
 3: CIC com $1,07 \times 10^{-4}$ PFU eq.

Para a amostra HCV com carga viral 144.000 UI/ml, Figura 55, obteve-se uma performance similar, com um C_T médio para o HCV de 29 nas duas extrações, também independente da concentração do CIC adicionado. Para o controle interno com $1,07 \times 10^{-3}$ PFU eq. e com $1,07 \times 10^{-4}$, os $C_{T(s)}$ obtidos foram 30 e 33 respectivamente.

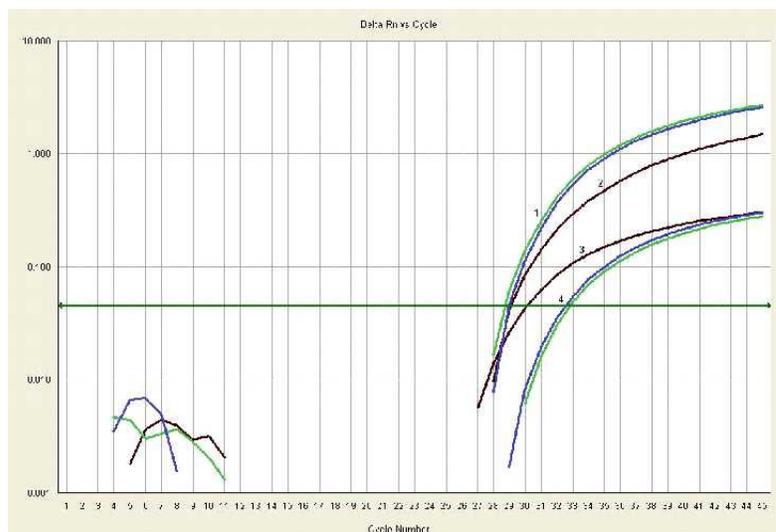


FIGURA 55 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES DO HCV (CARGA VIRAL 144.000 UI/ml) COM O CIC

NOTA: 1: HCV com 1.207 UI em combinação com o CIC amplificado em 3;
 2: HCV com 1.207 UI em combinação com o CIC amplificado em 4;
 3: CIC com $1,07 \times 10^{-3}$ PFU eq.;
 4: CIC com $1,07 \times 10^{-4}$ PFU eq.

A amostra estudada e que tinha a menor carga viral foi concentrada duas vezes originando as frações A e B.

Na PCR para a fração A não se observou amplificação para o HCV e o CIC, amplificou no C_T 29. Na fração B mais concentrada, a amplificação do CIC foi obtida no C_T (32), e a do HCV no C_T 35. As quantidades de PFU e cargas virais descritas na legenda estavam presentes em 5 μ l de cDNA colocados na placa de PCR e estão descritas nas Tabelas 11, 12 e 13. Na Figura 56 pode-se observar os resultados obtidos nas amplificações.

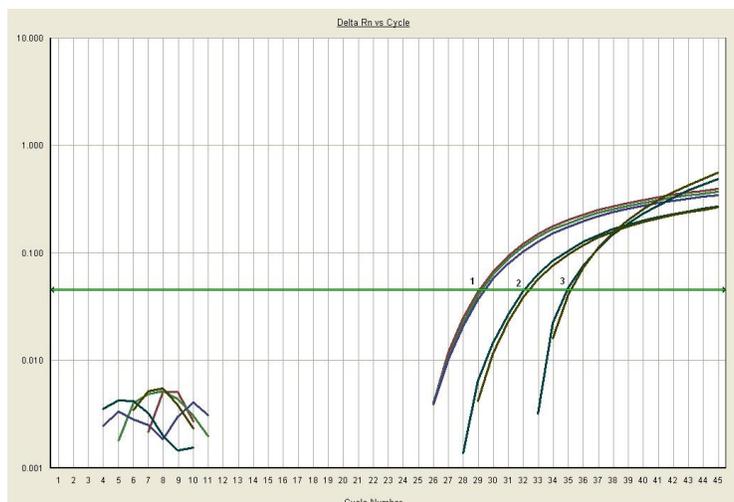


FIGURA 56 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES HCV (CARGA VIRAL 1.270 UI/ml) COM O CIC

NOTA: 1: CIC com $1,08 \times 10^{-3}$ PFU eq. (fração A);
 2: CIC com $4,05 \times 10^{-3}$ PFU eq. (fração B);
 3: HCV com 40 UI (fração B).

Com as informações geradas pelas combinações HCV com 1.270 UI/ml com o CIC foi possível concluir-se que as 0,025 PFU eq. do CIC adicionados em 195 ul de amostra clínica, antes da extração, foi detectada satisfatoriamente e não interferiu na amplificação da amostra com carga viral mais baixa. A amplificação do CIC na fração B, mais concentrada ocorreu no C_T 35 ou seja foi deslocada 3 C_T (s), para a frente em relação a não concentrada, cuja amplificação foi obtida no C_T 32, ao contrário do que era esperado, demonstrando que a presença da sequência do vírus interferiu na amplificação do CIC nesta PCR multiplex.

A mesma performance foi observada para os cDNA(s) frações A e B, obtidos a partir de uma quantidade menor do CIC $2,5 \times 10^{-3}$ PFU eq. em 248 UI de HCV. A Figura 57 mostra estes resultados.

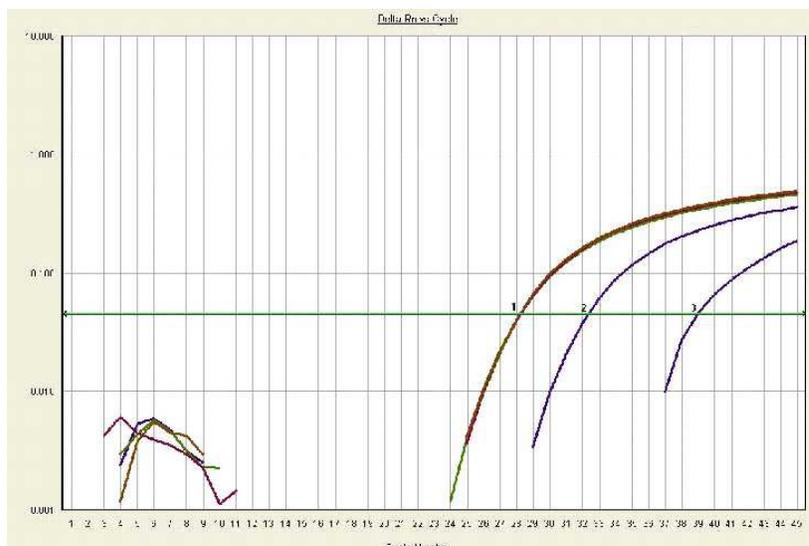


FIGURA 57 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES HCV (1.270 UI/ml) COM O CIC

NOTA: 1: CIC com $1,08 \times 10^{-4}$ (fração A);
 2: CIC com $4,05 \times 10^{-4}$ (fração B);
 3: HCV com 40 UI.

Na PCR para a fração A, o CIC amplificou na C_T 28 e o HCV com carga viral não amplificou. Na fração B, o HCV, amplificou no C_T 39 e o CIC no C_T 32. Da mesma forma o C_T obtido para o CIC na amostra mais concentrada, fração B foi deslocado 4 $C_{T(s)}$ para a frente em relação a fração A, que amplificou no C_T 28. Estes resultados são similares aos dados obtidos anteriormente quando estudou-se a concentração $2,5 \times 10^{-2}$ PFU eq. em 195 ul de HCV.

Desta forma os resultados obtidos para as amostras de HCV estudadas mostraram que as duas concentrações de CIC que foram testadas, não interferiram na amplificação de amostras com carga viral alta, como 545.600 UI/ml, e permitiram a detecção de cargas virais de até 40 UI/reacção, proveniente de uma amostra de HCV com 1.270 UI/ml. Porém os $C_T(s)$ obtidos para a amplificação de 5 ul de CIC com $2,5 \times 10^{-2}$ PFU eq. adicionados em 195 ul de amostra clínica entre PCR(s) demonstrou menor variação do que os obtidos para diluições maiores do controle. Portanto neste trabalho escolhemos esta diluição de CIC para ser adicionada às amostras clínicas de HCV, uma vez que ela pode ser detectada sem interferir na amplificação de amostras com carga viral baixa como a que foi testada.

4.9.3 PCR Multiplex "TWO STep" para o HCV e o MS2

Para definir-se a quantidade de controle interno não competitivo MS2 a ser adicionada às amostras clínicas de hepatite C utilizou-se o mesmo esquema de testagem feito para o controle interno competitivo. Preparou-se diluições seriadas do MS2 e colocou-se 5 ul de cada uma destas diluições em 195 ul de plasma humano negativo para doenças infecciosas. Adicionou-se também 5 ul das mesmas diluições em 195 ul de amostra de hepatite C com carga viral 86.200 UI/ml.

Baseando-se no resultado da titulação obtida para o MS2 definida como sendo igual a $2,0 \times 10^6$ PFU/ml calculou-se o número de PFU, presente em cada diluição feita e nas diluições adicionadas ao plasma e à amostra de hepatite C. Estes cálculos estão apresentados na Tabela 14.

TABELA 14 - PFU DO MS2 NAS COMBINAÇÕES MS2/HCV

Diluições do MS2	PFU nas Diluições ^a	PFU MS2 nas Combinações MS2/plasma e MS2/HCV ^b	PFU pós Extração ^c	PFU /PCR ^d
1×10^{-5}	12	1×10^{-1}	$1,5 \times 10^{-2}$	$7,5 \times 10^{-4}$
1×10^{-6}	12×10^{-1}	1×10^{-2}	$1,5 \times 10^{-3}$	$7,5 \times 10^{-5}$
1×10^{-7}	12×10^{-2}	1×10^{-3}	$1,5 \times 10^{-4}$	$7,5 \times 10^{-6}$
1×10^{-8}	12×10^{-3}	1×10^{-4}	$1,5 \times 10^{-5}$	$7,5 \times 10^{-7}$
1×10^{-9}	12×10^{-4}	1×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-6}$	$7,5 \times 10^{-8}$
1×10^{-10}	12×10^{-5}	1×10^{-6}	$1,5 \times 10^{-7}$	$7,5 \times 10^{-9}$
1×10^{-11}	12×10^{-6}	1×10^{-7}	$1,5 \times 10^{-8}$	$7,5 \times 10^{-10}$

NOTA: ^a PFU em 50 ul da diluição preparada

^b PFU em 5ul da diluição do MS2 adicionada em 195 ul de amostra de plasma;

^c PFU no c-DNA após a purificação com Microcon;

^d PFU em 5 ul.

Obeve-se RNA(s) usando estas combinações preparadas e cDNA.

Os cDNA(s) foram amplificados na PCR em tempo real. Na Figura 58 pode-se observar os resultados da amplificação de diferentes diluições do MS2 colocadas

em amostra de plasma negativo. Obteve-se amplificação até a diluição 1×10^{-8} que corresponde a $7,5 \times 10^{-7}$ PFU/reação.

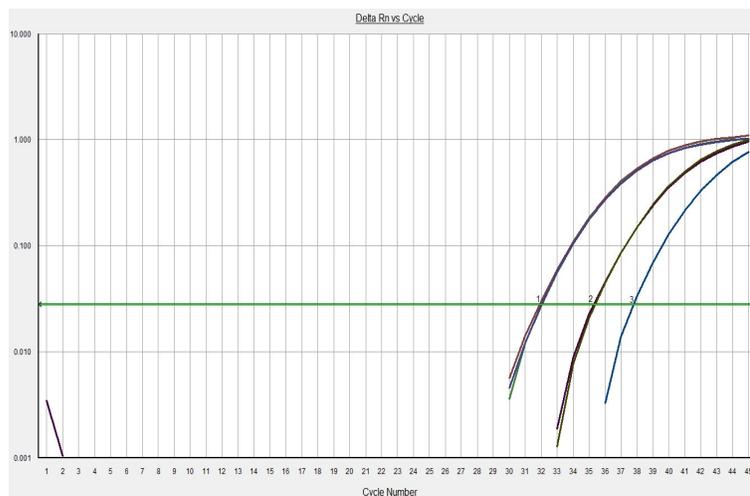


FIGURA 58 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES MS2/PLASMA

NOTA: 1: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-5}$ PFU;
2: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-6}$ PFU;
3: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-7}$ PFU.

Os resultados das amplificações obtidos para as três primeiras combinações HCV/MS2 preparadas colocando-se 1×10^{-2} PFU, 1×10^{-3} PFU e 1×10^{-4} PFU em 195 ul de amostra de HCV com carga viral 16.809 UI estão na Figura 59. A carga viral mostrada na figura refere-se aos 5 ul colocados na placa de PCR.

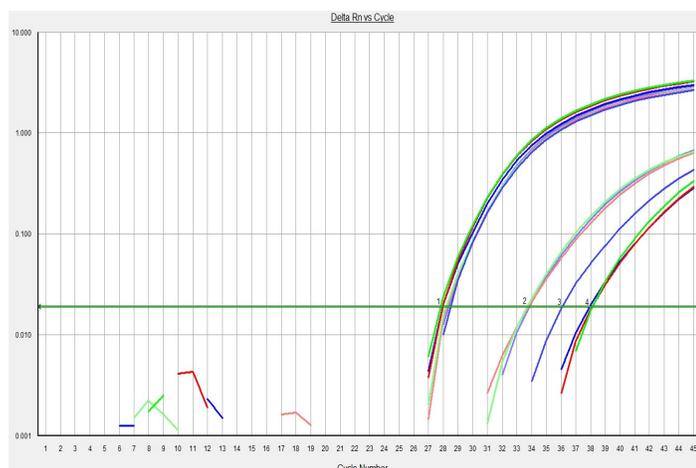


FIGURA 59 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES HCV/MS2

NOTA: 1: HCV com 106,5 UI;
 2: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-5}$ PFU;
 3: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-6}$ PFU;
 4: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-7}$ PFU.

Na imagem mostrada na figura pode-se observar que a amplificação do HCV, independente da quantidade de CI MS2 adicionado à mesma ocorreu no C_T 28, enquanto que a amplificação do controle interno não competitivo obedeceu uma sequência em função das diferentes diluições preparadas. As amplificações para as $7,5 \times 10^{-5}$ PFU, $7,5 \times 10^{-6}$ e $7,5 \times 10^{-7}$ PFU, presentes nos 5 ul de cDNA colocados na placa de PCR amplificaram respectivamente nos C_T (s) 34, 36 e 38. Os cDNA(s) contendo $7,5 \times 10^{-8}$, $7,5 \times 10^{-9}$ e $7,5 \times 10^{-10}$, não amplificaram adequadamente.

Comparando-se os resultados das combinações MS2/plasma e MS2/HCV, percebe-se que as $7,5 \times 10^{-5}$ PFU no plasma amplificaram no C_T 32 e na presença do HCV no C_T 34, enquanto que as $7,5 \times 10^{-6}$ e $7,5 \times 10^{-7}$ PFU adicionadas ao HCV foram amplificadas em C_T (s) muito próximos aos obtidos quando o CI MS2 foi adicionado ao plasma conforme mostrado na Figura 58.

Com os dados gerados pudemos concluir que nenhuma das concentrações do MS2 adicionadas as amostras clínicas interferiram na amplificação do HCV. As 106,45 UI de HCV presentes em 5 ul do cDNA das três combinações preparadas amplificaram nos mesmos valores de C_T . Entretanto a amplificação do controle interno com $7,5 \times 10^{-5}$ PFU/reação, proveniente das 1×10^2 PFU colocadas na amostra de hepatite C ocorre em um momento mais adequado da reação e neste estudo esta foi a concentração de escolha para ser colocada nas amostras clínicas. As concentrações $7,5 \times 10^{-6}$ e $7,5 \times 10^{-7}$, são detectadas, porém já não são mais quantificadas.

4.9.4 Avaliação Preliminar do Limite de Detecção da Técnica Multiplex com a Presença do Controle Interno não Competitivo

No estudo do limite de detecção da técnica de PCR em tempo real com o controle interno MS2, avaliou-se os resultados produzidos pela adição de 5 ul das preparações contendo respectivamente 1×10^{-1} PFU, e 1×10^{-2} PFU, adicionadas individualmente em 195 ul das amostras de HCV com 545.600 UI/ml, 144.000 UI/ml e 1.270 UI/ml utilizadas nos testes para o CIC. O procedimento adotado foi o mesmo aplicado para o CIC no que se refere as extrações das amostras. As cargas virais e as quantidades de MS2 usadas nas combinações HCV/MS2 podem ser observadas na Tabela 15.

TABELA 15 - PFU E CARGA VIRAL NAS COMBINAÇÕES HCV/MS2

Amostra	Carga Viral UI - HCV/MS2 ^a	PFU do MS2 - HCV/MS2 ^b	Carga Viral na PCR ^c	PFU do MS2 na PCR ^d
HCV	106.392	1×10^{-1}	4.574 UI	$7,5 \times 10^{-4}$
HCV	106.392	1×10^{-2}	4.574 UI	$7,5 \times 10^{-5}$
HCV	28.080	1×10^{-1}	1.207,45	$7,5 \times 10^{-4}$
HCV	28.080	1×10^{-2}	1.207,45	$7,5 \times 10^{-5}$
HCV	247,5	1×10^{-1}	213 UI	$7,5 \times 10^{-4}$
HCV	247,5	1×10^{-2}	213 UI	$7,5 \times 10^{-5}$

NOTA: ^a Carga viral do HCV em 200 ul da combinação HCV/MS2;

^b PFU em 200 ul da combinação HCV/MS2;

^c Carga viral do HCV em 5 ul;

^d PFU do MS2 em 5 ul.

Obeve-se RNA(s), usando estas preparações feitas. Estes RNA(s) foram concentrados e transcritos para cDNA.

Para a amostra de HCV com 1.270 UI/ml obteve-se também as frações A e B). A quantidade de PFU presente nesta amostra durante cada procedimento realizado desde a extração até a PCR em tempo real está mostrado na Tabela 16, enquanto que as cargas virais das amostras de HCV, estão descritas na Tabela 13 apresentada no Item 4.9.2 no estudo para o CIC.

TABELA 16 - PFU DO MS2 DA EXTRAÇÃO À PCR EM TEMPO REAL

MS2 - $2,0 \times 10^6$ PFU/ml	PFU MS2 dil 1×10^{-5}	PFUMS2 dil 1×10^{-6}
PFU em 5 ul da diluição preparada	1×10^{-1}	1×10^{-2}
PFU na extração (195 ul HCV + 5 ul CIC)	1×10^{-1}	1×10^{-2}
PFU - pós extração, eluição em 60 ul	1×10^{-1}	1×10^{-2}
PFU - RNA concentrado para 10 ul	1×10^{-1}	1×10^{-2}
PFU - RT com 8.6 ul de RNA	$8,6 \times 10^{-2}$	$8,6 \times 10^{-3}$
PFU - pós Microcon (volume final 100 ul)	$8,6 \times 10^{-2}$	$8,6 \times 10^{-3}$
PFU - Fração A (25 ul dos 100 ul pós microcon) ^a	$2,15 \times 10^{-2}$	$2,15 \times 10^{-3}$
PFU - 75 ul que restou dos 100 ul conc.para 20 ul (B)	$6,45 \times 10^{-2}$	$6,45 \times 10^{-3}$
PFU PCR com cDNA pós microcon em 100 ul	$4,3 \times 10^{-3}$	$0,43 \times 10^{-3}$
PFU PCR (5 ul)com cDNA pós microcon em 25 ul	$0,43 \times 10^{-2}$	$0,43 \times 10^{-3}$
PFU PCR (5ul) com cDNA pós microcon em 20 ul	$1,61 \times 10^{-2}$	$1,61 \times 10^{-3}$

NOTA: ^a Os procedimentos descritos a partir deste Item foram feitos somente para as combinações do MS2 com HCV (1.270 UI/ml)

Todos os transcritos obtidos foram amplificados na PCR em tempo real. A Figura 60 apresenta os resultados da amplificação para as combinações do MS2 com HCV (545.600 UI/ml). Foram feitas duas preparações. Na primeira delas colocou-se 1×10^{-1} PFU em 195 ul da amostra de HCV com 106.392 UI e na segunda 1×10^{-2} PFU. Na imagem pode-se observar que a carga viral 4.574 UI presente nos 5 ul colocados na microplaca de PCR das duas combinações amplificou no C_T 25, independente da concentração do CI MS2, adicionado à amostra, enquanto que o MS2 das duas preparações com $7,5 \times 10^{-4}$ PFU/reação e $7,5 \times 10^{-5}$ PFU/reação, amplificaram respectivamente nos $C_{T(s)}$ 29 e no C_T 35. Portanto as partículas virais presentes em 1×10^{-1} PFU e 1×10^{-2} PFU quando adicionadas a amostras de HCV com carga viral alta, no momento da extração não interferem na amplificação do vírus na PCR em tempo real.



FIGURA 60 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES HCV (545.600 UI/ml) COM O CI MS2

NOTA: 1: HCV com 4.574 UI;
 2: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-4}$ PFU;
 3: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-5}$ PFU.

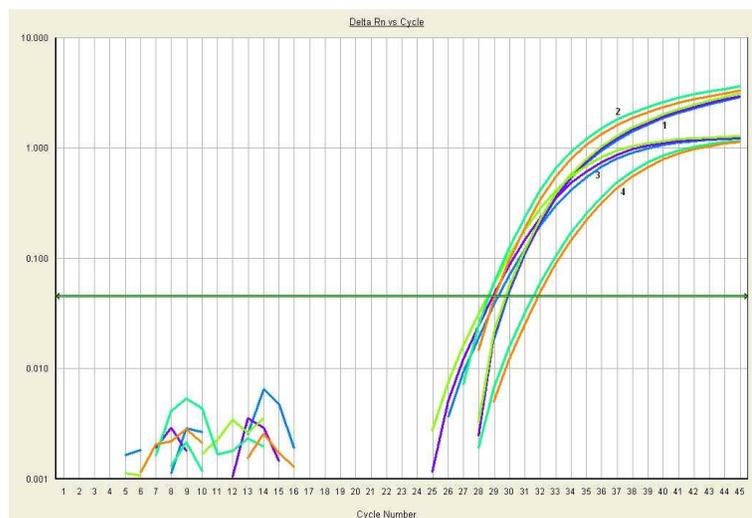


FIGURA 61 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DAS COMBINAÇÕES HCV (144.000 UI/ml) COM O CI MS2

NOTA: 1: HCV, com 1.207 UI, da combinação com o CI MS2 mostrado em (3);
 2: HCV, com 1.207 UI, da combinação com o CI MS2 mostrado em (4);
 3: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-4}$ PFU;
 4: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-5}$ PFU.

As amplificações obtidas para as combinações do HCV com 144.000 UI/ml com o CI MS2, preparadas colocando-se 1×10^{-1} PFU e 1×10^{-2} PFU em 195 ul de HCV com 28.080 UI podem ser observadas na Figura 61.na qual a imagem mostra que as 1.207 UI de HCV das duas preparações na PCR amplificaram no C_T 29.

Porém as curvas que foram obtidas para as diferentes quantidades de CI MS2 não permaneceram sobrepostas durante toda a amplificação como pode-se observar. O MS2 das duas combinações com $7,5 \times 10^{-4}$ PFU/reação e $7,5 \times 10^{-5}$ PFU/reação amplificaram respectivamente nos C_T 29 e 32.

As combinações HCV (1.270 UI/ml) com o CI MS2 conforme já descrito foram submetidas a procedimentos com o objetivo de concentrar as amostras. Os resultados das amplificações para as frações A e B podem ser visualizados na Figura 62.



FIGURA 62 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES HCV (1.270 UI/ml) COM O MS2

NOTA: 1: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-4}$ PFU;
 2: CI MS2 com $7,5 \times 10^{-4}$ PFU;
 3: HCV frações A e B.

Nesta figura pode-se observar que a amplificação da fração A foi obtida 1 C_T antes que a fração B mais concentrada. Esta mesma performance foi observada no momento em que testou-se o CIC. O HCV referente as frações A e B amplificaram no C_T 32.

A amplificação obtida para a combinação HCV/MS2 com 1×10^{-2} PFU não foi satisfatória. Desta forma, com as informações disponíveis pudemos concluir que as concentrações de MS2 adicionadas à amostras com carga viral alta, intermediária e baixa em nenhum momento interferiram na amplificação do vírus. Entretanto os valores de C_T que foram obtidos quando adicionou-se 1×10^{-1} PFU do MS2, apresentaram-se mais reprodutíveis entre as PCR (s).

4.10 OPTIMIZAÇÕES PCR EM TEMPO "ONE STEP"

4.10.1 PCR Multiplex "ONE STEP" para o HCV e o Controle Interno Competitivo

Os oligos HCV-F/HCV-R2 e as sondas HCV-S e HCV-SCI3 já avaliadas na PCR em Tempo Real "Two Step" foram testados no formato "ONE STEP". Para a otimização deste formato de PCR foram preparadas soluções contendo diferentes concentrações dos "primers" e das sondas e estudou-se a performance de cada uma delas. Optou-se pela reação descrita no Item 3.23 que foi feita colocando-se 10 pmol do primer HCV-F, 20 pmol do HCV-R2, 2 pmol da sonda HCV-SCI3 e 10 pmol da sonda do HCV em 50 ul de reação. Testou-se inicialmente a performance desta PCR no formato "singleplex" usando como molde da reação 20, 10 e 5 ul de RNA, contendo respectivamente 0,033 PFU eq., 0,017 PFU eq. e 0,008 PFU eq./reação. Este RNA foi extraído a partir de 200 ul de uma solução do CIC com 5 PFU eq./ml. As curvas de amplificação obtidas para as diferentes concentrações de CIC podem ser vistas na Figura 63, onde observa-se que as reações ocorreram nos C_T (s) 25, 26, e 28 para as 0,033 PFU eq., 0,017 PFU eq. e 0,008 PFU eq., respectivamente. Estas amplificações foram satisfatórias para as três concentrações de controle interno testadas.

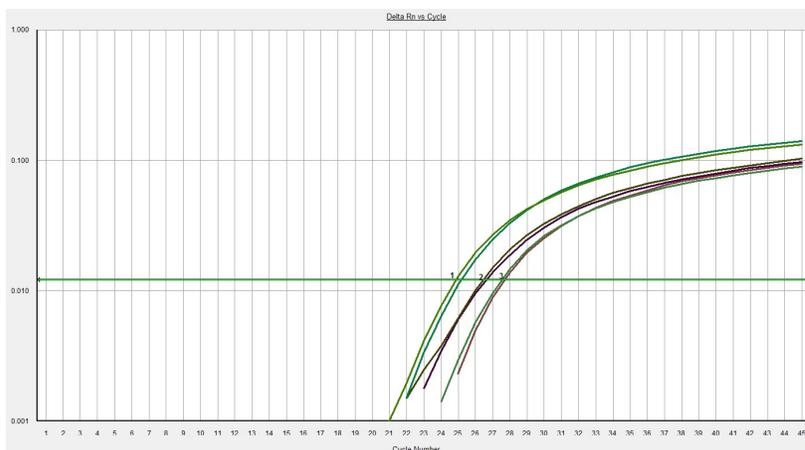


FIGURA 63 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O CONTROLE INTERNO COMPETITIVO NA PCR "ONE STEP"

NOTA: 1: CIC com 0,033 PFU eq;
 2: CIC com 0,017 PFU eq;
 3: CIC com 0,008 PFU eq.

Avaliou-se então a performance desta reação usando RNA extraído a partir de 200 μ l de plasma de origem humana. Esta amostra apresentou resultado reagente no teste ELISA para anti-HCV na triagem feita no Banco de Sangue, mas não foi quantificada por meio de técnica de biologia molecular. O resultado obtido pode ser visto na Figura 64.

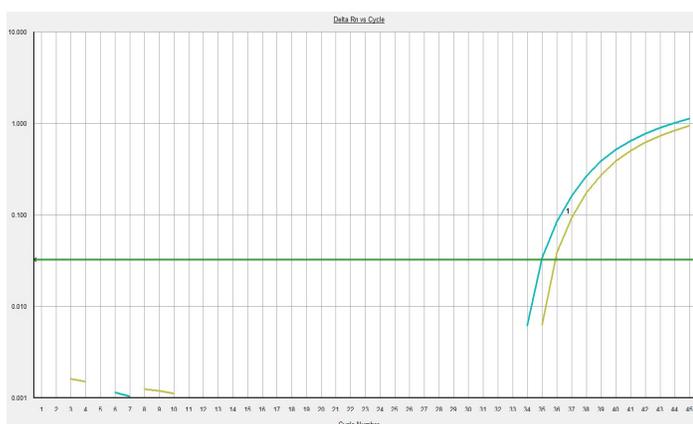


FIGURA 64 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA A AMOSTRA DE HCV USADA NA PCR "ONE STEP"

NOTA: 1: HCV

Preparou-se a combinação HCV/CIC colocando-se 5 ul do controle interno competitivo com 0,25 PFU eq. em 195 ul do plasma reagente para anti-HCV. Esta concentração de controle interno foi definida nos experimentos feitos usando a PCR em Tempo Real "TWO STEP". A Figura 65 mostra o padrão de amplificação do RNA obtido a partir desta preparação. As 0,008 PFU eq. e o HCV presentes em 10 ul de RNA colocados como molde na reação foram amplificadas no C_T 35. A mesma quantidade de PFU eq. na "PCR singleplex" amplificou no C_T 28, conforme pode-se verificar na Figura 63. O HCV amplificou no mesmo C_T obtido quando testou-se a amostra pura indicando que a presença do controle interno na reação não alterou o padrão de amplificação do vírus. Ao contrário a amplificação do CIC, foi afetada durante a amplificação conjunta com o HCV (em comparação com os resultados da Figura 63). Porém, esta influência não parece invalidar a utilização do teste usando esta quantidade de CI adicionada ao plasma, que foi padronizada para o teste em formato "TWO STEP" Vale ressaltar, entretanto, que na reação, o formato "ONE STEP" possui 10 vezes mais CI que o formato "TWO STEP" (cf. Tabela 10).



FIGURA 65 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O HCV COM O CONTROLE INTERNO COMPETITIVO (0,041 PFU EQ.)

NOTA: 1: HCV;
2: CIC com 0,004 PFU eq.

Na Figura 66 a mesma combinação HCV/CIC foi amplificada colocando na reação 20 ul de RNA com 0,008 PFU eq. Nesta amplificação o controle interno foi obtido no C_T 33 e o HCV nos C_T 35 e 36. Portanto nenhuma das concentrações de CIC avaliadas interferiram na performance da reação para a amostra testada

confirmando que a adição de 5 ul de CIC com 5 PFU eq./ml aos 195 ul de plasma é satisfatória para controlar a reação conforme já havia sido demonstrado no momento em que testou-se a PCR em Tempo Real “TWO STEP”.

Testes adicionais, entretanto, devem ser realizados procurando-se avaliar a amplificação de amostras de HCV com diferentes cargas virais e a amplificação de quantidades menores de CI (ver discussão no próximo tópico).

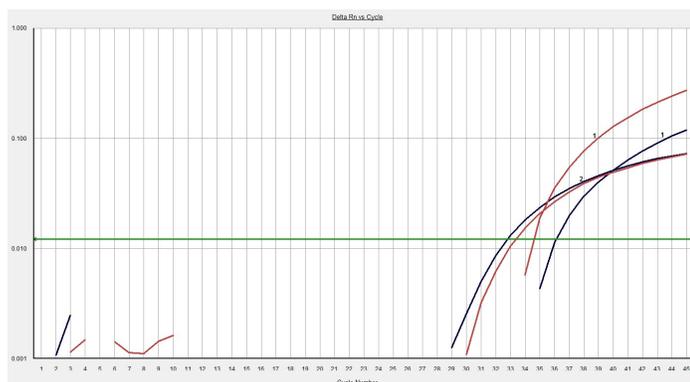


FIGURA 66 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O HCV COM O CONTROLE INTERNO COMPETITIVO (0,008 PFU EQ.)

NOTA: 1: HCV
2: CIC com 0,008 PFU eq.

4.10.2 PCR Multiplex "ONE STEP" com o MS2

Avaliou-se a PCR multiplex para as combinações HCV/MS2 usando os “primers” MS2-F5/MS2-R5 e as sondas MS2-S5 e HCV-S específicas para o MS2 e para o HCV respectivamente. A reação foi padronizada conforme descrito no Item 3.23 e utilizou-se 20 pmol dos “primers” HCV-R2 e do MS2-R5, 10 pmol do HCV-F, 10 pmol da sonda do HCV, 4 pmol da sonda MS2-S5. Inicialmente esta reação foi testada no formato “singleplex” usando RNA obtido a partir de uma solução de MS2 contendo 4 PFU/200 ul. As amplificações foram feitas com 20, 10 e 5 ul de RNA contendo respectivamente 1,33 PFU, 0,66 PFU e 0,33 PFU. Os resultados obtidos nestas reações podem ser observados na Figura 67. As reações para as três concentrações de PFU testadas ocorreram nos C_T (s) 24, 25 e 26.

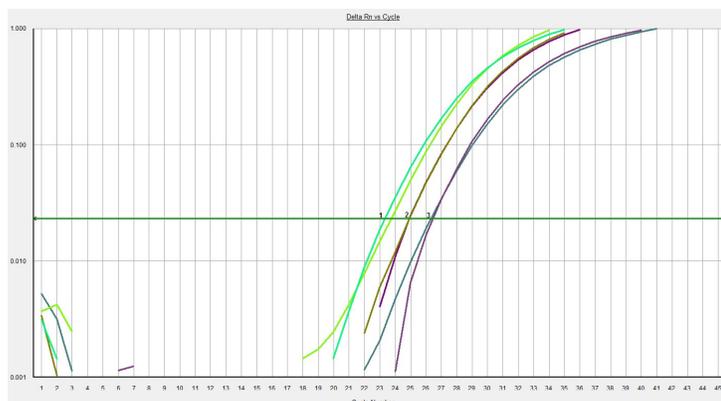


FIGURA 67 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O MS2 NA PCR "ONE STEP"

NOTA: 1: MS2 com 1,33 PFU;
2: MS2 com 0,66 PFU;
3: MS2 com 0,33 PFU.

Estudou-se também a performance da reação para a combinação HCV/MS2, preparada colocando-se 5 ul do MS2 contendo 0,1 PFU em 195 ul da mesma amostra de HCV utilizada no preparo da combinação HCV/CIC. O RNA obtido desta combinação foi amplificado na PCR multiplex. Na Figura 68 esta amplificação pode ser visualizada. O HCV amplificou no C_T 33 ou seja 2 $C_{T(s)}$ antes que na PCR "singleplex" (Figura 64) e as 0,016 PFU do MS2 presente em 10 ul de RNA amplificaram no C_T 32.



FIGURA 68 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO PARA O HCV COM O MS2 (0,016 PFU EQ)

NOTA: 1: HCV;
2: MS2 com 0,016 PFU.

A imagem da Figura 69 mostra a amplificação de um RNA obtido de uma preparação feita com amostra E6 do painel Optiquant quantificada com 5.000.000 UI em relação ao padrão internacional. Em 195 ul desta amostra com 162.500 UI colocou-se 5 ul do CI MS2 equivalente a 0,1 PFU. Na PCR o HCV amplificou no C_T 32 e o CI MS2 no C_T 40. A mesma quantidade de PFU na Figura 68 amplificou no C_T 32, mostrando a influência da presença do HCV na amplificação do CI MS2.

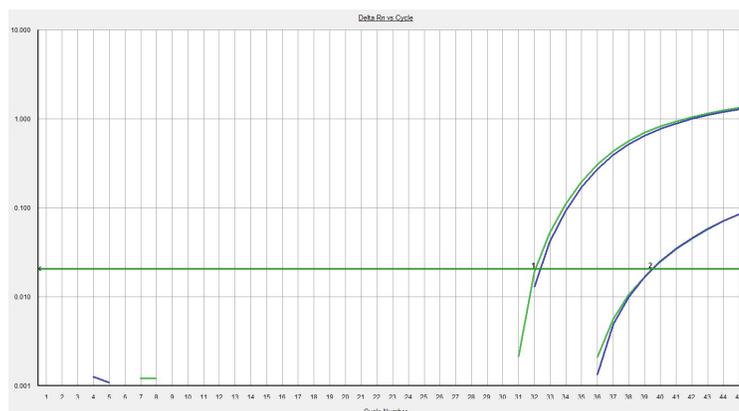


FIGURA 69 - CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DA AMOSTRA E6 PAINEL OPTQUANT COM O MS2 (0,033 PFU EQ.)

NOTA: 1: Amostra E6 do painel Optiquant com 162.500 UI;
2: MS2 com 0,016 PFU

A PCR em tempo real "ONE STEP" padronizada para o CIC e para o CI MS2 apresentou bons resultados porém existe a necessidade de mais testes serem realizados visando avaliar a amplificação de amostras de HCV com diferentes cargas virais em multiplex com o CIC e com o CI MS2. Da mesma forma a quantidade de CI, seja ele CIC ou MS2, também deve ser reavaliada, uma vez que 0,25 PFU eq. de CIC e 0,1 PFU de CI MS2 a serem adicionados ao plasma no teste formato "two step" resulta em uma quantidade maior de RNA de CI por reação no formato "one step".

4.11 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

A estabilidade de um reagente (controle interno) reflete a capacidade do mesmo de manter sua performance ao longo do tempo sendo por isso uma característica muito

importante a ser avaliada. Definir como este controle vai ser acondicionado quando incluído em uma técnica diagnóstica é um fator muito importante. Reagentes mantidos adequadamente são essenciais para garantir o desempenho de um produto diagnóstico dentro das condições padronizadas ao longo do tempo.

4.11.1 Estabilidade do CIC

O controle interno competitivo preparado foi mantido em geladeira com uma temperatura média de 4°C, durante um período de 2 meses. Após este período preparou-se alíquotas que foram estocadas a temperatura ambiente (TA), 4°C e no freezer a -20°C. No terceiro e no oitavo mês após a alíquotagem preparou-se separadamente 3 réplicas de RNA de cada condição. Os RNA(s) obtidos foram transcritos e os cDNA(s) obtidos foram amplificados na PCR em Tempo Real. Os resultados destas ampliações estão descritos na Tabela 17.

TABELA 17 - RESULTADOS DOS TESTE DE ESTABILIDADE FEITOS PARA O CIC

Amostra	Estocagem	Tempo de estocagem/ meses	C _T na PCR
CIC-1	TA	3	13
CIC-2	TA	3	8
CIC-3	TA	3	9
CIC-1	4°C	3	6
CIC-2	4°C	3	7
CIC-3	4°C	3	7
CIC-1	-20 °C	3	8
CIC-2	-20 °C	3	8
CIC-3	-20 °C	3	8
CIC-4	TA	8	13,5
CIC-5	TA	8	13,5
CIC-6	TA	8	13,6
CIC-4	4°C	8	7,6
CIC-5	4°C	8	7,9
CIC-6	4°C	8	8,4
CIC-4	-20 °C	8	8,7
CIC-5	-20 °C	8	8,5
CIC-6	-20 °C	8	9,9

Analisando-se os resultados da PCR em tempo real para as réplicas das 3 extrações feitas no terceiro mês podemos observar que os cDNA(s), das extrações 1, 2 e 3 do controle interno competitivo mantido a 4°C amplificou um C_T antes, que o cDNA do CIC mantido a -20°C e dois C_T (s) antes que o CIC mantido a temperatura ambiente nas extrações 2 e 3. A extração 1 do CIC mantido a TA, apresentou resultado divergente, porém ainda assim sugere que a estocagem a temperatura ambiente parece ser a mais desfavorável.

Este resultado se repetiu nas réplicas obtidas no oitavo mês. Os RNA(s) das alíquotas mantidas a 4°C amplificaram 1 C_T antes que as mantidas a -20°C e 6 C_T (s) antes que as amostras estocadas a TA.

Comparando-se os resultados dos RNA(s) obtidos das alíquotas estocadas a 4°C e a -20°C do terceiro e do oitavo mês observa-se que os RNA(s) do terceiro mês amplificaram com uma diferença média de menos que 1 C_T antes que os do oitavo mês, indicando que durante os cinco meses de estocagem houve uma perda de partículas muito pequena. Os RNA(s) das alíquotas mantidas a TA nas extrações 2 e 3 apresentaram uma diferença da ordem de 4 e 5 C_T (s).

Com os resultados obtidos foi possível concluir-se que a estocagem do CIC a 4°C produziu os melhores resultados na PCR, indicando uma perda menor de partículas ao longo do tempo. Porém a estocagem a -20°C produziu resultados muito próximos podendo ser considerada. E sem dúvida a condição mais desfavorável é a estocagem a temperatura ambiente.

4.11.2 Estabilidade do Controle Interno MS2

O MS2 foi estocado da mesma forma que o controle interno competitivo. Dois meses após preparou-se as alíquotas que foram mantidas a temperatura ambiente, a 4°C e a -20°C. Da mesma forma foram feitas as 3 réplicas de RNA, no oitavo mes após a estocagem. Estes RNA(s), foram transcritos usando o "primer" MS2-R5. O cDNA foi amplificado na reação de PCR em tempo real. Os resultados obtidos para estes cDNA(s) encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 - RESULTADOS DOS TESTES DE ESTABILIDADE FEITOS PARA O MS2

Amostra	Estocagem	Tempo de estocagem /meses	CT na PCR
MS2-	TA	3	9,2
MS2-	TA	3	9,3
MS2-	TA	3	8,9
MS2-	4°C	3	8,9
MS2-	4°C	3	9,3
MS2-	4°C	3	9,9
MS2-	-20 °C	3	9,1
MS2-	-20 °C	3	9,7
MS2-	-20 °C	3	10,16
MS2-	TA	8	12,6
MS2-	TA	8	12,3
MS2-	TA	8	12,4
MS2-	4°C	8	11,1
MS2-	4°C	8	10,7
MS2-	4°C	8	10,8
MS2-	-20 °C	8	11,2
MS2-	-20 °C	8	10,6
MS2-	-20 °C	8	11,04

Os resultados das amplificações dos RNA(s) do MS2 obtidos no terceiro mês extraídos usando as alíquotas que foram mantidas a 4°C, -20°C e TA apresentaram na PCR em tempo real $C_T(s)$ muito próximos nas 3 condições estudadas como pode-se observar na tabela.

O mesmo ocorreu com os RNA(s) obtidos no oitavo mês. Os RNA(s) das alíquotas mantidas a 4°C e a -20°C amplificaram também em $C_T(s)$ muito próximos, enquanto que os das alíquotas estocadas a TA amplificaram 2 $C_T(s)$ após. Comparando-se os resultados das amostras do terceiro e do oitavo mês estocadas a 4°C verificou-se que as amostras do terceiro mês amplificaram em média 1,1 C_T antes que as do oitavo mês. As mantidas a -20°C também amplificaram em média 1,3 $C_T(s)$ antes em relação as estocadas na mesma condição no terceiro mês, enquanto que as mantidas a TA no terceiro mês amplificaram 3 $C_T(s)$ antes que as do oitavo mês. Portanto da mesma forma que o CIC o CI MS2 apresentou boa

estabilidade quando mantido a 4°C e a -20°C. A estocagem a temperatura ambiente apresenta a maior perda de partículas do MS2 ao longo do tempo, sendo por isso a condição mais desfavorável.

5 DISCUSSÃO

A detecção e quantificação dos níveis de RNA do vírus da hepatite C se tornou parte essencial do diagnóstico e administração de pacientes infectados por HCV. Testes qualitativos têm sido muito usados para identificar infecções agudas e também portadores crônicos do vírus, enquanto que a quantificação do RNA têm por meta prever e monitorar terapias antivirais. Desta forma é essencial que os laboratórios diagnósticos reportem resultados precisos e seguros.

Nos últimos anos muitos testes comerciais e também não comerciais têm sido desenvolvidos empregando os avanços tecnológicos disponíveis. Dentre os baseados em biologia molecular, a PCR em tempo real aliada a métodos automatizados para extração, com performance mais consistente do que os métodos manuais, têm garantido resultados mais confiáveis e em menor tempo, uma vez que reduzem o manuseio das amostras. No entanto, ainda assim, é essencial a adoção de sistemas efetivos que assegurem a qualidade e o controle do laboratório de diagnóstico molecular conferindo confiança aos resultados gerados por uma metodologia. Neste sentido, têm sido estabelecidos programas de controle de qualidade internos e externos.

Os programas de controle de qualidade externo são interlaboratoriais e têm por objetivo padronizar os resultados de laboratórios diferentes através de análise comparativa dos resultados obtidos para alíquotas de um mesmo material sob a coordenação de um patrocinador que prepara estes controles, distribui para os laboratórios participantes, analisa os resultados obtidos e emite relatórios para que sejam adotadas medidas corretivas na vigência de possíveis erros. Normalmente são usados os painéis de proficiência. Esta avaliação externa normalmente é feita em intervalos de tempo regulares.

Ao contrário do controle de qualidade externo, o controle interno da qualidade é intralaboratorial e consiste na análise diária de amostras-controle com valores conhecidos. Através deste controle interno pode-se avaliar a qualidade dos insumos de um teste diagnóstico, a performance dos equipamentos e de todos os procedimentos laboratoriais envolvidos na geração de um resultado, com o objetivo de que este possa contribuir eficazmente no estabelecimento do diagnóstico pelo clínico.

Desta forma é imprescindível que as metodologias de biologia molecular desenvolvidas incluam controles internos capazes de monitorar o processo por inteiro desde a extração até a amplificação e detecção. Estes controles representam os alicerces de um sistema de qualidade e não podem ser negligenciados.

Diversos controles internos têm sido desenvolvidos e estão descritos na literatura. Estes controles baseiam-se na utilização de vírus animais, plasmídeos carreando sequências específicas de determinados patógenos, fagos como o Q-beta e o T4 e montagens baseadas na utilização de oligonucleotídeos. Em todas as situações pode-se observar que a produção desses controles e padrões não são processos triviais.

Neste trabalho nós descrevemos a construção de um controle interno específico para o vírus HCV baseado no bacteriófago MS2.

O MS2 é um vírus inócuo para o ser humano, não sendo necessários para a sua manipulação laboratórios especializados. Por ser um vírus RNA, seu manuseio durante os diversos procedimentos requer todos os cuidados exigidos para o HCV, que também é um vírus RNA. Dessa forma, quando o controle interno é colocado em uma amostra clínica de hepatite C, a sua presença no momento da amplificação garante todos os processos aos quais o HCV foi submetido. Assim, em um teste diagnóstico com um controle interno derivado deste bacteriófago, a ausência do HCV na reação, ou seja, um resultado negativo, é confiável pela presença do controle interno.

O MS2 têm um tamanho pequeno, composição relativamente simples e têm sido usado como organismo modelo em importantes áreas de pesquisa, incluindo replicação viral, infecção e montagem de partículas (ELASHVILLI *et al.*, 2005). Cada partícula de fago é constituída por 180 monômeros que formam a proteína do envoltório, uma cópia da proteína de maturação e uma única cópia de RNA genômico. A proteína do envoltório, além de sua função estrutural, funciona como uma proteína de ligação específica ao RNA, que reconhece e interage com uma estrutura em forma de alça no início do gene da replicase e esta interação é a responsável pela encapsidação específica do genoma viral (PEABODY *et al.*, 1993). Esta propriedade destes fagos têm sido muito explorada. A clonagem e expressão da proteína do envoltório em *Escherichia coli* têm permitido a montagem de partículas como vírus (VLPs), sem a necessidade de outros componentes virais. Além disto a encapsidação de RNA(s) heterólogos por esta proteína também têm

sido possível. Dessa forma, o MS2 representa um sistema atrativo para montagens de bioengenharia visando a produção de vírus com propriedades modificadas e de partículas como vírus que têm sido desenvolvidas para uso como padrões biológicos e que tem sido disponibilizados comercialmente para alguns vírus (*Armored RNA*, Assuragen).

Por estas razões, o MS2 foi escolhido para ser utilizado usado na construção do controle interno proposto neste trabalho. A disponibilidade do seu RNA de fonte comercial também incentivou o seu uso, dispensando a prática do cultivo em bactérias que poderia gerar problemas de contaminação. Além disso, considerou-se que o RNA do MS2 têm uma estrutura secundária complexa, tornando difícil a sua amplificação na RT-PCR. Isto assegura que se o cDNA do MS2 é sintetizado, qualquer vírus HCV presente também será. Utilizando o RNA do MS2, foi possível o desenvolvimento de um controle interno competitivo (CIC) específico para o vírus HCV com as vantagens inerentes a este tipo de controle, que é amplificado utilizando exatamente o mesmo *pool* de reagentes, necessitando de apenas uma sonda para a sua diferenciação, evitando assim o risco de interações que resultam da presença de múltiplos “primers” e também a presença de um segundo amplicon que pode interferir na reação.

A montagem deste controle se baseou na utilização do plasmídeo pET-47b(+). A inserção das 3.569 bases que compõe o genoma do MS2 no pET-47b(+) originou o pET47b(+) - MS2. A adição de um gene sintético feito baseando-se na sequência do HCV ao gene da replicase do MS2 deste plasmídeo originou o pET 47b(+) - MS2 - Sequência Sintética.

Controles internos para monitoramento de resultados negativos da PCR baseado em plasmídeos têm sido usados desde que a metodologia de PCR foi desenvolvida e aplicada ao diagnóstico. No próprio Instituto de Biologia Molecular foi desenvolvido um controle para o HCV baseado em plasmídeo (DUARTE *et al.*, 2006). Dentro desta linha, o vetor pET-47b(+) - MS2 - Sequência Sintética por si só poderia ser usado como controle interno da reação de PCR. Entretanto, as fases de extração e transcrição não seriam controladas.

O genoma do MS2 recombinante (mutante, com a inserção da sequência sintética) inserido no plasmídeo foi expresso na bactéria *E. coli* BL21(DE3)pLysS e as partículas do bacteriófago foram montadas no próprio meio, obtendo-se assim o RNA do bacteriófago encapsidado, ou seja protegido da degradação por RNases, da

mesma forma que o vírus da hepatite C está presente nas amostras clínicas. Daí o interesse da utilização deste vírus como controle do processo de extração e purificação do RNA do HCV. A decapsulação do RNA de ambos acontecerá durante a fase de extração, se todas as condições forem adequadas. Qualquer falha na extração ou em qualquer uma das outras fases resultará na ausência de sinal na fase de amplificação do controle interno na PCR em tempo real, indicando que o processo não ocorreu adequadamente e precisa ser repetido.

A sequência sintética inserida no MS2 é derivada do HCV, por isso este controle é específico para ser utilizado em técnica diagnóstica para este vírus sendo amplificado pelos mesmos "primers" usados para o mesmo.

A inserção desta sequência sintética no gene da replicase do MS2 afetou a capacidade de replicação do vírus, fato este evidenciado na técnica de cultura em dupla camada usada para a titulação de bacteriófagos. Não foram obtidas placas de lise no momento em que foi feita esta metodologia para o controle interno competitivo. Com este resultado concluímos que a presença do gene sintético no gene da replicase comprometeu a síntese da enzima RNA replicase e conseqüentemente o bacteriófago perdeu a capacidade de replicação e tornou-se portanto não propagável. Esta característica conferiu ao controle construído algumas vantagens à já vantajosa escolha de um bacteriófago como controle pelos motivos acima expostos. Como primeira vantagem, a eliminação da possibilidade deste bacteriófago recombinante proliferar-se espontaneamente no laboratório clínico diminui os problemas decorrentes de contaminação de estoques bacterianos destinados a outros fins. A utilização de um bacteriófago sem a capacidade de auto-replicação também eliminou a possibilidade da ocorrência de mutações e deleções no RNA padrão, uma vez que a transcrição e a tradução das proteínas do MS2 é feita pela T7 RNA polimerase produzida pela bactéria BL21 e não depende da RNA replicase do MS2, uma enzima de conhecida baixa fidelidade.

Outra vantagem oferecida pelo CIC desenvolvido está relacionada ao fato do genoma recombinante do MS2 estar inserido em um plasmídeo dentro da bactéria BL21 garantindo assim a contínua disponibilidade e qualidade do controle interno produzido. A bactéria por sua vez, congelada adequadamente com crioprotetor em temperatura de -70°C , é um sistema estável. O plasmídeo isolado da bactéria também apresenta boa estabilidade se mantido congelado. Desta forma, a produção deste controle é um processo bastante prático e envolve basicamente a manutenção

do estoque bacteriano em condições adequadas e a expressão e purificação das partículas do bacteriófago. Além disto, ela não requer ambientes especializados e como o RNA do bacteriófago é protegido, a produção e manutenção do mesmo não é dependente de ambiente livre de enzimas RNase(s). A expressão do bacteriófago foi feita em condições assépticas, usando meios de cultura devidamente esterilizados que foram manipulados em cabine de fluxo laminar garantindo a presença única da bactéria BL21 no meio. Porém a purificação das partículas a partir da BL21 foi realizada no laboratório em condições normais. Portanto, por este fago ser um vírus inócuo para o ser humano, o processo de produção é muito mais simples do que o cultivo celular de alguns vírus que requer ambientes especializados (com níveis de biossegurança maiores que 1). Além disto a forma como foi idealizado permite que a produção deste controle possa ser facilmente extrapolada para uma produção em escala industrial.

O lote de controle interno produzido foi feito a partir de 500 ml de uma cultura de *E. coli* e foram geradas $1,5 \times 10^7$ PFU eq. A partir de nossos resultados, definimos que devem ser adicionados na amostra clínica 0,025 PFU eq. para a extração conjunta do RNA. Desta forma, 1 lote de CIC nos padrões gerados é suficiente para ser adicionado a 2×10^8 amostras clínicas no início da extração. Portanto o rendimento da produção é alto e o custo é baixo se comparado ao custo de um controle comercial como o *Armored RNA*.

Soma-se a isto ainda a estabilidade dos dois controles internos construídos. Avaliou-se na PCR em tempo real RNA(s) obtidos de alíquotas deste controle interno mantidas a 4°C, -20°C e à temperatura ambiente, três e oito meses após o seu preparo. Os dados obtidos mostraram que as alíquotas do controle mantidas em geladeira exibiram ampliações bastante satisfatórias e em C_T (s) muito próximos nos dois períodos analisados, indicando que o controle interno é estável se mantido sob esta condição por um período de 8 meses, tempo este que transcorreu desde o momento em que o controle interno foi produzido. Desta forma é possível que este tempo possa ser ainda maior. Esta estabilidade é uma característica muito importante uma vez que garantirá que este controle possa ser facilmente transportado no momento de uma distribuição e possa ser facilmente mantido “onboard” em equipamentos de automação.

O CIC MS2 exibiu um comportamento similar com relação à estabilidade demonstrando que a alteração produzida no gene que codifica a enzima RNA replicase não teve nenhuma influência na estabilidade do bacteriófago mutante.

Existe ainda, neste sistema de controle, a flexibilidade de se introduzir uma variedade de sequências de RNA(s) diferentes, sendo portanto possível a produção de controle para outros microorganismos. O vetor pET-47b(+) - MS2, pode ser transformado e modificado pela inserção de outros genes sintéticos feitos a partir de sequências de outros patógenos específicos, cuja técnica diagnóstica se quer controlar.

Uma vez construído, o CIC foi incorporado na reação de PCR em tempo real para a detecção do vírus da hepatite C. Foram feitos testes, baseando-se no fato de que na PCR competitiva o cDNA do controle interno compete pelos "primers" com o cDNA alvo podendo abolir o seu sinal, produzindo um resultado falso-negativo. Desta forma determinou-se cuidadosamente a mais baixa concentração de CIC que apresentou resultados quantificáveis na PCR em tempo real e que não interferiu na amplificação de diferentes cargas virais do HCV. Levou-se em consideração também que a adição de concentrações maiores de CIC à amostras clínicas podem não interferir na amplificação do HCV em amostras com carga viral maior porém podem não ter papel em sinalizar que a reação está adequada em condições de inibições fracas que poderiam interferir na amplificação de amostras com baixo título viral de HCV. Estas considerações puderam ser evidenciadas nos experimentos feito com amostras de cDNA do HCV, frente a diferentes concentrações de cDNA do CIC, descrito no Item 4.9.1.

Nestes experimentos observou-se que quanto menor for a carga viral da amostra de HCV maior é a interferência da concentração do CIC na amplificação do HCV. Quando testou-se o cDNA proveniente de amostra de HCV com carga viral muito baixa não obteve-se amplificação com nenhuma concentração de CIC testada. Da mesma forma, nenhuma amostra amplificou quando se utilizou o CIC bastante concentrado. Foi necessário então avaliar-se a influência de concentrações menores do controle interno na amplificação do HCV.

Em um segundo momento testou-se na PCR em tempo real amostras de cDNA obtidas da extração simultânea do HCV e do CIC. Diferentes quantidades de PFU foram analisadas. Os dados obtidos indicaram que a presença de 0,025 PFU eq. em 195 ul de amostra clínica de hepatite C não interferiu na determinação de

cargas virais da ordem de 120,46 UI/reacção e não gerou resultados falso-negativos. O controle misturado às amostras pode ser detectado da mesma forma que quando adicionou-se 0,025 PFU eq. em amostras de plasma negativo. As cargas virais das amostras obtidas na PCR estabeleceram uma boa correlação com as cargas virais obtidas usando-se métodos comerciais.

Avaliou-se, então, esta mesma concentração de controle interno e uma segunda com 0,0025 PFU eq. e verificou-se neste estudo que as duas concentrações não interferiram na amplificação de amostras de HCV com carga viral alta e permitiram a detecção de até 40 UI/reacção. No entanto os resultados exibidos pelo CIC mais concentrado apresentaram menor variação e por isso definiu-se esta concentração como sendo a ideal para ser adicionada às amostras clínicas no momento da extração. As mesmas quantidades de CIC e de MS2 padronizadas na PCR em tempo real "TWO STEP", foram usadas na otimização da PCR multiplex "ONE STEP" cujos resultados indicaram que quantidades menores desses controles podem ser utilizadas, resultando em uma maior sensibilidade da técnica para detectar cargas virais ainda mais baixas.

Em um exercício preliminar de determinação do limite de detecção feito usando a metodologia de PCR em tempo real "TWO STEP" indicou a possibilidade de detectar até 40 UI/reacção, proveniente de uma amostra com 1.270 UI/ml que foi concentrada. Extrapolando-se estes dados para a técnica de PCR em tempo real "ONE STEP" que usa diretamente o RNA concluímos que neste formato poderiam ser detectadas amostras com 600 UI/ml. Vários fatores podem ser levados em consideração que questionam este valor de 600 UI/ml, uma vez que as metodologias atualmente disponíveis apresentam limites de detecção de cargas virais bem mais baixas. Primeiro, as amostras utilizadas foram quantificadas por uma metodologia comercial, em seguida foram estocadas em freezer a -70°C, foram retiradas do freezer e transportadas. Desta forma a sua quantificação no momento em que foram usadas para testar o controle interno podem não refletir a exata quantidade de cópias virais obtidas no primeiro teste realizado. Segundo, para mimetizar um teste em que todo o material extraído fosse inteiramente aproveitado na PCR, as amostras foram concentradas/diluídas/manipuladas (pois só tínhamos disponível os reagentes para realização de um teste "TWO-STEP"), o que pode ter causado a perda de material. Para definitivamente estabelecer o limite de detecção da nossa

metodologia em formato "ONE STEP", devemos analisá-la utilizando um padrão internacional de amostras de HCV com quantidade conhecida.

A utilização do "kit" QIAamp® MiniElute Virus neste trabalho restringiu a utilização de 200 µl de amostra inicial. A possibilidade de se utilizar outros "kits" ou mesmo sistemas automatizados de obtenção de ácidos nucleicos que permitam a extração de um volume maior de amostra poderá aumentar a sensibilidade do teste.

Um desdobramento do nosso objetivo inicial, a construção de um controle competitivo para ser utilizado em um teste de detecção do HCV baseado em PCR em tempo real, foi a obtenção do bacteriófago MS2 a partir do plasmídeo pET-47b(+)-MS2, criado durante o processo de construção do CIC. Este plasmídeo permite que este fago RNA seja produzido utilizando a T7 RNA polimerase da *E. coli* BL21 (DE3)pLyS e sirva como um controle interno não competitivo alternativo para o teste diagnóstico de detecção do ácido nucleico do HCV. Na verdade, as partículas virais geradas a partir deste plasmídeo podem ser utilizadas como controle interno não competitivo em testes diagnósticos de qualquer vírus RNA.

As partículas virais de MS2 obtidas no momento da expressão conservaram as propriedades de lise e estes bacteriófagos puderam ser titulados em PFU/ml e serviram como padrão na quantificação do fago recombinante, o nosso CIC. Da mesma forma como acontece com o MS2 recombinante, a produção do MS2 por meio de transformação do plasmídeo e expressão via T7 RNA polimerase, em substituição a técnica que utiliza as propriedades infectivas do bacteriófago, oferece vantagens uma vez que diminui a possibilidade da ocorrência de mutações na sequência de nucleotídeos do genoma do bacteriófago. Além disso, garante-se que o fago produzido não se propague por meio de lise, uma vez que não está na presença de uma bactéria F', reduzindo a possibilidade de contaminação do laboratório com o bacteriófago.

O CI MS2 também foi expresso em 500 ml de meio de cultura e após a recuperação e purificação obteve-se um total de 2×10^7 PFU. Este controle não competitivo também foi testado na mesma técnica diagnóstica para o vírus HCV. Padronizou-se uma PCR multiplex não competitiva para amplificação simultânea do HCV e do CI MS2, usando "primers" específicos para cada um. Neste multiplex duas reações com cinéticas diferentes foram feitas simultaneamente e não houve competição dos alvos pelos mesmos "primers". Recomenda-se que neste tipo de PCR a amplificação do controle interno seja limitada controlando-se a concentração

dos "primers" específicos para o controle interno Hoofar *et al.* (2004), limitando-se desta forma a competição do controle interno e do microorganismo alvo pela DNA polimerase e por outros componentes da PCR.

Na reação padronizada utilizou-se quantidades equivalentes dos "primers" e das sondas do HCV e do CI MS2. Otimizou-se também a concentração do MS2 a ser adicionada à amostra clínica, antes da extração. Determinou-se cuidadosamente a mais baixa concentração do CI MS2 que apresentou resultados reprodutíveis sem interferir na amplificação do HCV. Para isto avaliou-se o comportamento de diferentes concentrações deste controle frente a diferentes cargas virais do HCV e definiu-se que a adição de 0,1 PFU do MS2 é a concentração ideal para ser adicionada em 195 μ l de amostra, uma vez que foi detectada em um C_T adequado da PCR e não interferiu na detecção das cargas virais testadas.

Comparando-se as PCR(s) otimizadas para os dois controles internos observa-se que a PCR competitiva para a amplificação do CIC e do HCV foi otimizada com uma concentração menor de partículas virais 0,025 PFU eq., enquanto que a PCR não competitiva para o CI MS2 e o HCV foi otimizada com 0,1 PFU, ou seja, foi necessário colocar-se 25 vezes mais fagos visando obter o mesmo C_T na amplificação dos controles, indicando que a eficiência da amplificação do CI MS2 foi menor que a amplificação do CIC. É sabido que a eficiência das amplificações em formato multiplex usando dois pares de "primers" é menor que as em formato uniplex, às vezes deixando até de funcionar a amplificação de um dos alvos. A presença de mais de um par de "primers" na PCR multiplex é um dos fatores que pode diminuir a eficiência das reações aumentando a possibilidade da ocorrência de reações inespecíficas, principalmente devido a formação de dímeros de "primers" que são produtos inespecíficos e que podem ser amplificados mais eficientemente que o alvo desejado, consumindo componentes da reação. Na reação padronizada, estas interações parecem ter ocorrido em níveis toleráveis que podem ter diminuído a eficiência das amplificações da reação multiplex, mas ainda assim permitiram a amplificação simultânea do CI MS2 e do HCV sem interferir na carga viral das amostras testadas conforme descrito no Item 4.9.3. Da mesma forma que o CIC, o CI MS2 permitiu a detecção de 40 UI de HCV/reação nos experimentos realizados.

Tanto a reação de detecção do HCV utilizando o CIC quanto a que utilizou o CI MS2 apresentaram boa performance, indicando que os dois controles podem ser

utilizados. O CIC, entretanto, é específico para o HCV e a reação de PCR utiliza apenas um par de "primers" e duas sondas com fluoróforos diferentes, sendo neste caso assegurada a performance dos "primers".

O MS2 é um controle inespecífico e por isso pode ser usado em técnicas diagnósticas para outros patógenos sendo necessária apenas a padronização da reação de PCR multiplex, considerando as interações entre os "primers" e as sondas que serão utilizados. A desvantagem em relação a um controle interno competitivo é que, por necessitar de um conjunto de "primers" específico a ele (sonda também, porém esta variável não só existe como é necessária quando se utiliza um CIC), a possibilidade de padronização de uma reação multiplex é menor e o tempo para essa padronização normalmente é maior, do que quando se utiliza o mesmo par de "primers". Além disto os "primers" que amplificam o alvo não são controlados e o custo é mais elevado.

Portanto nós atingimos a meta proposta neste trabalho e desenvolvemos dois controles internos derivados de bacteriófago. cuja utilização foi otimizada em um teste de detecção do vírus da hepatite C, baseada em PCR em tempo real.

6 CONCLUSÃO

O plasmídeo pGEM[®]-T Easy - MS2 contendo o genoma inteiro do MS2 construído neste trabalho proposto serviu de base para a construção do vetor de expressão pET-47b(+) - MS2 que foi clonado em bactéria hospedeira adequada e usado com sucesso para produzir o controle interno não competitivo MS2. No próprio meio de expressão foram ativados os processos gênicos regulatórios que desencadearam a montagem e encapsidação do RNA deste bacteriófago de acordo com o ciclo de vida do mesmo e demonstraram que o processo de construção do vetor não produziu alterações que pudessem comprometer a viabilidade das partículas virais produzidas.

O vetor pET-47b(+) - MS2 - SS, com o genoma do MS2 modificado, também permitiu a expressão satisfatória do controle interno não competitivo. Esse controle interno é uma partícula viral que encapsidou o RNA recombinante do MS2 contendo uma sequência sintética criada baseando-se na sequência de bases de um fragmento da região 5' UTR do HCV. A presença desta sequência garantiu a especificidade deste controle para o HCV e destituiu a partícula viral de sua capacidade replicativa. Ainda pode-se mencionar outras características importantes deste controle desenvolvido. A primeira delas é a sua estabilidade ao longo do tempo. Este controle foi mantido a 4°C, durante 8 meses e não apresentou perda significativa das partículas virais. Outra diz respeito ao genoma do MS2 que foi encapsidado por inteiro e provavelmente conservou as estruturas secundárias características no genoma do bacteriófago "wild type" representando assim um alvo de difícil amplificação. E uma terceira é a presença de todas as proteínas virais na partícula montada o que pode representar um controle mais eficaz da fase de lise do processo de extração, garantindo a função do controle interno que é simular a presença do microorganismo objeto de pesquisa que por sua vez é uma partícula viral completa. As duas últimas propriedades indicam que este controle pode ser um alvo mais representativo do que outros controles preparados usando apenas algumas proteínas do MS2 e pequenas extensões de bases do alvo.

Portanto conforme o proposto nós construímos vetores que representam as bases para a produção contínua de dois controles internos, um não competitivo e outro competitivo, os dois para serem misturados à amostra clínica antes da

extração do RNA do HCV, sendo então amplificados simultaneamente a este na PCR em tempo real que hoje é uma metodologia que representa um dos mais recentes avanços na área de diagnóstico e que pode fornecer resultados ainda mais confiáveis quando validada pela presença do controle interno.

Os dois controles desenvolvidos são RNA(s) protegidos e por isso têm a propriedade de avaliar todas as etapas de um teste diagnóstico. Sua aplicabilidade foi analisada. Ambos se mostraram promissores quando amplificados na PCR em tempo real "singleplex" e multiplex com amostras clínicas de hepatite C. As 0,1 PFU do MS2 e 0,025 PFU eq. do MS2 recombinante foram definidas como sendo quantidades ideais para serem adicionadas às amostras clínicas antes da extração e que na PCR em tempo real foram detectadas de forma satisfatória sem interferir na amplificação de amostras de HCV com cargas virais altas e baixas.

A amplificação na PCR em tempo real "singleplex" demonstrou também a aplicabilidade do MS2 recombinante como controle positivo de um teste diagnóstico. Para atender esta função este controle não deverá ser adicionado à amostra clínica e o seu RNA deverá ser extraído e amplificado em tubo distinto do das amostras clínicas. Além disto este controle interno por ser específico e poder ser quantificado em relação a um padrão internacional poderá ser utilizado como um padrão de referência para o estabelecimento de uma técnica diagnóstica quantitativa

Portanto os controles internos propostos neste trabalho foram desenvolvidos com sucesso, são muito promissores e podem efetivamente contribuir na validação de metodologias diagnósticas para a hepatite C, doença de grande importância para a saúde pública no Brasil e no mundo. Além disto o controle interno não competitivo têm a potencialidade de ser utilizado como controle interno não competitivo em testes do mesmo formato idealizados para outros patógenos cujo genoma é RNA. Da mesma forma o CIC pode ser adaptado para controlar outras metodologias, uma vez que o vetor pET47b(+) - MS2 pode servir como base para o desenvolvimento de controles internos para técnicas diagnósticas usadas para detectar outros vírus. Assim como foi desenvolvida uma sequência sintética baseada no HCV é possível criar-se sequências derivadas de outros patógenos que podem ser inseridas neste vetor produzindo-se então no momento da expressão partículas virais específicas para os mesmos. Outra opção é a montagem de um gene sintético contendo sequências de diversos patógenos, produzindo-se assim um controle interno único, porém específico para diversas metodologias de PCR em tempo real.

Portanto o controle interno desenvolvido possui enorme valor agregado e abriu perspectivas para a criação de outros controles internos e também para o estabelecimento de técnicas diagnósticas para outros patógenos.

7 PERSPECTIVAS

A avaliação do formato final de um teste diagnóstico para HCV contendo um dos controles não foi o escopo do presente trabalho, mas podemos visualizar as etapas seguintes que seriam realizadas visando este fim. São elas:

Avaliar a metodologia de diagnóstico otimizada com o controle interno frente a amostras de HCV de diferentes genótipos e com diferentes cargas virais (painel comercial Optiquant HCV RNA da Acrometrix, calibrado em relação ao Padrão Internacional da Organização Mundial da Saúde).

Definir a especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade da metodologia diagnóstica otimizada e avaliar os resultados obtidos para estes parâmetros comparando com os das metodologias padrão-ouro;

Avaliar a capacidade da metodologia diagnóstica em quantificar o HCV, usando o controle interno competitivo como padrão.

Testar o controle desenvolvido usando o mesmo como um controle positivo para validar a técnica do HCV

8 REFERÊNCIAS

BARBEAU, J. M.; GOFORTH, J.; CALIENDO, A. M. *et al.* Performance characteristics of a quantitative TaqMan Hepatitis C virus RNA analyte-specific reagent. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3739-3746, 2004.

BARRERA, J. M.; FRANCIS, B.; NELLES, E. M. *et al.* Improved detection of anti-HCV in pos-tansfusion hepatitis by a third generation ELISA. **Vox Sanguinis**, v. 68, p. 15-18, 1995.

BERKHOUT, B.; SMIT, M. H.; SPANJAARD, R. A.; BLOM, T. *et al.* The amino terminal half of the MS2-coded lysis protein is dispensable for functions: implications for our understanding of coding region overlaps. **The EMBO Journal**, v. 4, n. 12, p. 3315-3320, 1985.

BERNGRUBER, T. W.; KUIPERS, O. P.; WEISSING. Evolution of viral development of RNA phage MS2 under experimentally disturbed gene balance. p. 24-46, cap. 2.

BRANDÃO, A. B. M.; FUCHS, S. C.; SILVA, M. A. A. *et al.* Diagnóstico da hepatite C na prática médica: revisão da literatura. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 9, n. 3, p.161-168, 200.

BURGGRAF, S.; OLGEMÖLLER, B. Simple technique for internal control of real - time amplification assays. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 819-825, 2004.

BURKARDT, H. J. Standardization and Quality Control of PCR Analyses. **Clin. Chem. Lab Med**, 38 (2), p. 87-91, 2000.

BUSEK, S.; OLIVEIRA, G. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p.117-123, 2003.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, p. 23-39, 2002.

CASTELAIN, S.; DESCAMPS, V.; THIBAUT, V. *et al.* TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantification. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, p. 227-234, 2004.

CHENG, Y.; NIU J.; ZHANG, Y. Preparation of his-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time Reverse Transcription - PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3557-3561, 2006.

CHEVALIEZ, S.; PAWLITSKY, J. M. Hepatitis C virus: virology, diagnosis and management of antiviral therapy. **World J. Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p. 2461-2466, 2007.

CHOO Q.; KUO, G.; WEINER, A. J.; OVERBY, L. R.; BRADLEY D. W. *et al.* Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science**, v. 244, n. 4902, p. 359-62, 1989.

CLANCY, A.; CROWLEY, B.; NIESTERS, H. *et al.* The development of a qualitative real - time RT PCR assay for the detection of hepatitis C virus. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.27, n. 12, p. 1177-1182, 2008.

CLELAND, A.; NETTLETON, P.; JARVIS, L.M. *et al.* Use of bovine viral diarrhea virus as an internal control for amplification of Hepatitis C virus. **Vox Sanguinis**, v. 76, n. 3, p. 170-174, 1999.

COLUCCI, G.; FERGUSON, J.; HARKLEROAD, C.; LEE, S. *et al.* Improved COBAS TaqMan hepatitis C virus test (version 2.0) for use with high pure system: enhanced genotype inclusivity and performance characteristics in a multisite study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n. 11, p. 3595-3600, 2007.

DINGLE, K. E.; CROOK, D.; JEFFERY, K. Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription - PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1003-1011, 2004.

DORAK, M. T. Real - Time PCR (Advanced Methods Series). **Taylor and Francis**, Oxford, p. 1-14, 2006.

DREIER, J.; STÖRMER, M.; KLEESIEK, K. Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4551-4557, 2005.

DUARTE, C.A.B. Detecção e quantificação do vírus da hepatite C através de RT-PCR em Tempo Real. Universidade Federal do Paraná, p.1-47, 2006.

DUBUISSON, J. Hepatitis C proteins. **World Gastroenterology**, v. 13, n. 17, p. 2406-2415, 2007.

ELASHVILI, I.; KUZMANOVIC, D. A.; Krueger, S. Effects of Sample impurities on the analysis of MS2 bacteriophage by small-angle neutron scattering. **Edgewood Chemical Biological Center**, p. 1-18, 2005.

ELASHVILLI, I.; KUZXMANOVIC, D. A.; KRUEGER, S. *et al.* Effects of sample impurities on the analysis of MS2 Bacteriophage by small-angle neutron scattering. **Edgewood Chemical Biological Center**, p. 2-18, 2005.

EROGLU, C.; PINARBAS, E.; Hepatitis C vírus: genome organization, viral proteins, and implications in disease pathogenesis. **Turk J. Biol.**, v. 24, p. 253-269, 2000.

FERREIRA, C. T. Hepatites virais: aspectos da epidemiologia and prevenção. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n. 4, p. 473-87.

FIERS, W.; CONTRERAS, F. ; DUERINCK, F. *et al.* Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. **Nature**, v. 260, p. 500-507, 1976.

FILETTE, M. D.; JOU, W. M.; BIRKETT, A. *et al.* Universal influenza A vaccine: Optimization of MS2-based constructs. **Virology**, v. 337, p. 149-161, 2005.

GARSON, J. A.; GRANT, P. R.; AYLIFFE, U. *et al.* Real - time quantification of hepatitis B virus DNA using automated sample preparation and murine cytomegalovirus internal control. **Journal of Virological Methods**, v. 126, p. 207-213, 2005.

GERMER, J. J.; ZEIN, N. N. Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 76, p. 911-919, 2001.

GERRIETS, J. E.; GREINER, T. C.; GEBHART, C.L. Implementation of a T4 extraction control for molecular assays of cerebrospinal fluid and stool specimens. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 1, p. 28-32, 2008.

GRABOW, W. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. **Water S.A.**, v. 27, n. 2, 2001.

GROENEVELD, H.; THIMON, K.; DUIN J. V. Translational control of maturation-protein synthesis in phage MS2: a role for kinetics of RNA folding? **Cold Spring Harbor Laboratory**, v. 1, p. 79-88, 1995.

GUILLEMETTE, H. L. G.; FABIANI, F. L. Detection and Quantification of serum or plasma HCV RNA: mini review of commercially available assays. **Hepatitis C: Methods and Protocols**, 2. ed., v. 510, p. 3-14, 2009.

HALFON, P.; BOURLIERE, M.; PENARANDA G. *et al.* Real - time PCR assay for hepatitis C Virus (HCV) RNA quantification are adequate for clinical management of patients with chronic HCV infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2507-2511, 2006.

HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N. *et al.* Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, 2004.

HYMAS, W.; STEVENSON J.; TAGGART, E. W. Use of lyophilized standards for the calibration of newly developed real time PCR assay for human herpes type six (HHV6) variants A and B. **Journal of Virological Methods**. v. 128, p. 143-150, 2005.

JONGE, H. J. M. H.; FEHRMANN, R. S. N.; BONT, E. S. J. M. B. *et al.* Evidence based selection of housekeeping genes. **PloS ONE**. 2007. Disponível em: <www.plosone.org>.

JORGENSEN, P. A.; NEUWALD, P. D. Standardized hepatitis C virus RNA panels for nucleic acid testing assays. **Journal Clinical Virology**, v. 20, p. 35-40, 2001.

KRAJDEN, M.; ZIERMANN, R.; KHAN, A. *et al.* Qualitative detection of hepatitis C virus RNA: Comparison of analytical sensitivity, clinical performance , and workflow of the Cobas Amplicor HCV Test Version 2.0 and the HCV transcription-mediated amplification qualitative assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2903-2907, 2002.

KUZMANOVIC, D. A.; ELASHVILI, I.; CONNELL, C. *et al.* Resolution of the spatial distribution of the bacteriophage MS2 protein and RNA components. **Edgewood Chemical Biological Center**, p.1-20, 2005.

KUZMANOVIC, D. A.; ELASHVILI, I.; WICK, C. *et al.* Bacteriophage MS2: Molecular Weight and Spatial Distribution of the protein and RNA components by small - angle neutron scattering and virus counting. **Structure**, v. 11, p. 1339-1348, 2003.

KUZMANOVIC, D. A.; ELASHVILI, I.; WICK, C. *et al.* The MS2 coat protein shell is likely assembled under tension: a novel role for the MS2 bacteriophage protein as revealed by small-angle neutron scattering. **Journal Molecular Biology**, v. 355, p. 1095-1111, 2006.

LAPERCHE, S.; ELGHOZZI, M.; MOREL P. *et al.* Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing? **Transfusion**, v. 45, 12, p. 1965-1972, 2005.

LAPERCHE, S.; MARREC, N. L.; GIRAULT, A. *et al.* Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3877-3883, 2005.

LAZARO, D. R.; D'AGOSTINO, M.; PLA, M. *et al.* Construction strategy for an internal amplification control for real-time diagnostic assays using nucleic acid sequence - based amplification: development and clinical application. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5832-5836, 2004.

LICIS, N.; DUIN, J. V.; BALKLAVA, Z. *et al.* Long - range translational coupling in single - stranded RNA bacteriophages: an evolutionary analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 13, p. 3242-3246.

MAAROUFI, Y.; BRUYNE, J. M.; DUCHATEAU, V. Development of a multiple internal control for clinical diagnostic real-time amplification assays. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, p. 183-191, 2006.

MACKAY, I. M. Real - time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, 3, p. 190- 212, 2004.

MACKAY, I. M.; ARDEN. K. E.; NITSCHKE, A. Real - Time PCR in Virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 6, p. 1292-1305, 2002.

MAYO. J. M. E. Etiologia y patogenia de las hepatitis viricas. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 24, n. 1, p. 45-56, 2006.

MEERTEN, D. V.; ZELMER, M.; REGNIER, P. *et al.* In vivo oligo(A) insertions in phage MS2: role of *Escherichia coli* poly (A) polymerase. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 19, p. 3891-3898, 1999.

MURPHY, D. G.; WILLEMS, B.; DESCHENES, M. *et al.* Use of Sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of Hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5'untranslated region sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p.1102-1112, 2007.

NEUMAIER, M., BRAUN, A.; Wagener, C. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 12-26, 1998.

NIESTERS, H. G. M. Clinical virology in real - time. **Journal of Clinical Virology**, v. 25 (S3 - S12), 2002.

NIESTERS, H. G. M., Standardization and quality control in molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn* 1 (2), p. 129-131, 2001.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; OGUNKOLADE, W. SPUD. A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. **Analytical Biochemistry**, 351, p. 308-310, 2006.

NOVAIS, C.M, ALVES, M.P. PCR em Tempo Real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*,p.10-13, 2004.

TANURI, A.COSTA, L.C., BRINDEIRO, R., Construction of a selectable *nef*-defective live-attenuated human immunodeficiency virus expressing *Escherichia coli* gpt gene. *Virology*, n 268, p. 79-86, 2000.

O'CONNEL, K. P.; BUCHER, J. R.; ANDERSON, P. E. *et al.* Real - time fluorogenic reverse transcription - PCR assays for detection of bacteriophage MS2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 478-483, 2006.

OAKLEY, H. J. A universal test to determine the integrity of RNA, and its suitability for reverse transcription, in animal tissue laboratory specimens. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 459- 464, 2007.

PALOSKE, B. L.; WALKERPEACH, C. R.; OBERMOELLER, R. D. *et al.* Armored RNA technology for production of ribonuclease - resistant viral RNA controls and standards. **Journal Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3590 -3594.

PAWLOTS, J. M. Use and Interpretation of Virological Tests for Hepatitis C. **Hepatology**, v.36, n. 5, p. S65-S73, 2002.

PAWLOTS, J. M.; BOUVIER-ALIAS, M.; HEZODE, C. *et.al.* Standardization of Hepatitis C virus RNA quantification. **Hepatology**, v. 32. n. 3, p. 654-659, 2000.

PEABODY, D. S. A viral platform for chemical modification and multivalent display. **Journal of Nanobiotechnology**, v.1, n. 5, p. 1-8, 2003.

PEABODY, D. S. Role of the coat protein-RNA interaction in the life cycle of bacteriophage MS2. **Molecular & General Genetics**, v. 254, p. 358-364, 1997.

PEABODY, D. S. The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein. **The EMBO Journal**, v.12, n. 2, p. 595-600, 1993.

PEABODY, D.S. A Viral Platform for Chemical Modification and Multivalent Display. **Journal of Nanobiotechnology**, p. 1-8, 2003.

PEABODY, ED.S.; WHEELER, B. M.; MEDFORD, A.; JORDAN, S. K. *et al.* Immunogenic display of diverse peptides on virus - like particles of RNA phage MS2. **Journal Molecular Biology**, p. 2-24, 2009.

PENIN, F.; DUBUISSON, J.; REY, F.A. ; MORADPOUR, D. *et al.* Structural biology of hepatitis C virus. **Hepatology**, v. 39, n. 1, p. 5-19, 2004.

PERERVA, T.P.; MIRYUTA, A. Y.; MIRYUTA, N. Yu. Interactions of RNA-containing bacteriophages with host cell: MS2-induced mutants of *E.coli* and the occurrence of DNA-containing derivatives of the bacteriophage MS2. **Tsitologiya I Genetika**, v. 42, n. 1, p. 77-94, 2008.

PICKETT, G. G.; PEABODY, D. S. Encapsidation of heterologous RNA(s) by bacteriophage MS2 coat protein. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n.19, p. 4621-4626, 1993.

PODZORSKI, R. P. Molecular testing in the diagnosis and management of hepatitis C virus infection. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 126, p. 285-290, 2002.

POOT, R. A.; TSAREVA, N. V.; BONI, I. V. *et al.* RNA folding kinetics regulates translation of phage MS2 maturation gene. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 94, p. 10110-10115, 1997.

ROLFE, K. J.; PARMAR, S.; MURURI, D. An internally controlled, one step, real-time RT - PCR assay for norovirus detection and genogrouping. **Journal of Clinical Virology**, v. 39, p. 318-321, 2007.

RUMNIEKS, J.; FREVALDS, J.; CIELENS, I. *et al.* Specificity of packaging mRNAs in bacteriophage GA virus - like particles in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Universitatis**, v. 745, p. 145-154, 2008.

SALDANHA, J.; LELIE, N.; HEATH, A. *et al.* Establishment of the First International Standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. **Vox Sanguinis**, v. 76, n. 3, p. 149-158, 1999.

SCHNURIGER, A.; DOMINGUEZ, S.; VALANTIN, M. A. *et al.* Early detection of hepatitis C virus infection by use of a new combined antigen-antibody detection assay: potential use for high-risk individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n. 4, p. 1561-1563, 2006.

SCOTT, J. D.; GRETCH, D. R. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. v. 297, n. 7, p. 724- 732, 2007.

SEME, K.; POLJAK, M.; BABIC, D. *et al.* The role of core antigen in management of hepatitis C: a critical review. **Journal Clinical Virology**, v. 32, n. 2, p. 92-101, 2005.

SIMMONDS, P.; SMITH, D. B.; MCOMISH, F.; YAP, P. L. *et al.* Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1053-1061, 1994.

STÖCHER, M.; BERG J. Internal control DNA for PCR assays introduced into Lambda phage particles exhibits nuclease resistance. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2163-2166, 2004.

STÖCHER, M.; LEB, V.; BERG J. A convenient approach to the generation of multiple internal control DNA for a panel of real-time PCR assays. **Journal of Virological Methods**, v. 108, p. 1-8, 2003.

STÖCHER, M.; LEB, V.; HÖLZL, G.; *et al.* A simple approach to the generation of heterologous competitive internal controls for real-time PCR assays on the LightCycler. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, p. S47-S53, 2002.

THELLIN, O.; ZORZI, W.; LAKAYE, B. *et al.* Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal Biotechnology**, v. 8, n. 75, p. 291-295, 1999.

TOROPOVA, K.; BASNAK, G.; TWAROCK, R. *et al.* The three - dimensional structure of genomic RNA in bacteriophage MS2: implications for assembly. **Journal Molecular Biology**, v. 375, p. 824-836, 2008.

VERMEHREN, J.; KAU, A.; GÄRTNER, B. C.; GÖBEL, R. *et al.* Differences between two real - time PCR-based hepatitis C virus (HCV) assays (Real - time HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3880-3891, 2008.

VILLANOVA, G.V., GARDIOL, D., TABORDA, M.A., *et al.* Strategic Approach To Produce Low-Cost, Efficient, and Stable Competitive Internal Controls for Detection of RNA Viruses by Use of Reverse Transcription-PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 11, p. 3555-3563, 2007.

WALKERPEACH, C. R.; PALOSKE, B. L. DNA bacteriophage as controls for clinical viral testing. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 11, p.1970-1971, 2004.

WALKERPEACH, C. R.; WINKLER, M.; DUBOIS, D. B. Ribonuclease - resistant RNA Controls (Armored RNA) for Reverse Transcription - PCR, Branched DNA, and Genotyping assays for Hepatitis C Virus. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2079-2085, 1999.

WATSON. S.; MERCIER, S.; BYE, C. Determination of suitable housekeeping genes for normalisation of quantitative real - time PCR analysis of cells infected with human immunodeficiency virus and herpes viruses. **Journal Virology**, v. 4, n. 130, p. 1-5, 2007.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION T. Detection and monitoring of virus infections by real time PCR. **Molecular aspects of Medicine**, v. 27, p. 254-298, 2006.

WEI, Y.; CHANGMEI, Y.; WEI, B. *et al.* RNase-resistant virus-like particles containing long chimeric RNA sequences produced by two-plasmid coexpression system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1734-1740, 2008.

WONG, L. M.; MEDRANO, J. F. Real - time PCR for mRNA quantification. **Biotechniques**, v.39, n. 1, p. 75-82, 2005.

YU, X.F.; PAN, J. C.; YE, R. *et al.* Preparation of armored RNA as a control for multiplex real - time reverse transcription - PCR detection of Influenza Virus and Severe Acute Respiratory Syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 837-841, 2008.

ZHAO, L.; Ma, Y.; ZHAO, S. Armored RNA as positive control and standard for quantitative reverse transcription- polymerase chain reaction assay for rubella virus. **Archives of Virology**, v. 152, p. 219-224, 2007.