

## DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE PCR SEMIQUANTITATIVA UTILIZANDO PLASMÍDIO CLONADO COM PARTE DO GENE gB DE CITOMEGALOVÍRUS

DEVELOPMENT OF A SEMI-QUANTITATIVE PCR METHOD USING A PLASMID CLONED WITH PART OF THE gB GENE OF CYTOMEGALOVIRUS

Lauro J Marin<sup>1</sup>; Aldo A Cunha<sup>2</sup>; Victor H Aquino<sup>1</sup> & Luiz T M Figueiredo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Aluno pós-graduando na Área de Bioagentes Patogênicos (Virologia) Imunologia Básica e Aplicada, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (FMRP/USP)<sup>2</sup>Aluno pós-graduando em Clínica Médica, FMRP/USP. <sup>3</sup> Docente do Departamento de Clínica Médica e responsável pela Unidade Multidepartamental de Pesquisa em Virologia, FMRP/USP.

**CORRESPONDÊNCIA:** Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900, Ribeirão Preto, SP. E-mail: ltmfigue@fmrp.usp.br

MARIN LJ; CUNHA AA; AQUINO VH & FIGUEIREDO LTM. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene gB de citomegalovírus, **Medicina, Ribeirão Preto**, 35, 85-94, jan./mar. 2002.

**RESUMO:** A infecção por citomegalovírus é disseminada em nosso meio e costuma acometer, com significativa morbimortalidade, indivíduos imunodeprimidos, especialmente, transplantados de medula óssea e de rim bem como pacientes com AIDS. Neste trabalho, descrevemos o desenvolvimento de uma PCR semiquantitativa para detectar e quantificar cargas de CMV, presentes em materiais clínicos. Para tanto, inserimos em plasmídios PCR II (Invitrogen, USA), o fragmento com 296 pares-base do gene da glicoproteína B do CMV. Os plasmídios com inserto foram transfectados em *Escherichia coli*, multiplicados, verificados quanto à presença do inserto por seqüenciamento nucleotídico, purificados, e quantificados. Os plasmídios com inserto foram titulados em diluições decimais e as mesmas foram submetidas à PCR descrita anteriormente, que foi, também, utilizada nos testes semiquantitativos, permitindo determinar a sensibilidade da técnica, 867 cópias de CMV / mg de DNA. Com base nas densidades das bandas eletroforéticas dos *amplicons* de amostras clínicas, comparadas às da titulação de plasmídios contendo inserto de glicoproteína B do CMV, obtivemos as cargas virais. A técnica de PCR semiquantitativa, por nós padronizada, tem, como vantagens, o baixo custo e o fácil manuseio após sua padronização, podendo ser testada na detecção da carga de CMV em diferentes tipos de pacientes com suspeita de citomegalovirose.

**UNITERMOS:** Citomegalovírus. Carga Viral. Reação em Cadeia por Polimerase.

### 1. INTRODUÇÃO

Os citomegalovírus (CMV) infectam grande parte da população mundial, podendo atingir até 100% dos indivíduos, dependendo do nível socioeconômico, sendo sua incidência mais alta em países em de-

envolvimento<sup>(1)</sup>. Causam um grande número de síndromes clínicas, sendo importante fator de morbimortalidade em recém-nascidos, pacientes imunocomprometidos (transplantados) e acometidos pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) em estágio avançado<sup>(2,3,4)</sup>.

Os CMV são vírus pertencentes à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero Citomegalovírus. São os maiores membros da família, medindo de 150 a 200 nm de diâmetro. Seus genomas são compostos por DNA linear de fita dupla, contido em um capsídeo icosaédrico, de aproximadamente 100 nm de diâmetro e recoberto por uma estrutura proteica, denominada matriz<sup>(5)</sup>. Os vírus possuem um envelope de bicamada protéica, adquirido da membrana nuclear da célula infectada e que engloba todos os componentes virais<sup>(6)</sup>. O genoma viral possui 240 kilobases, onde, em cada extremidade, existem seqüências repetidas em orientações invertidas e justapostas internamente, as quais dividem o genoma em 2 segmentos, um longo e o outro curto. Cada segmento possui seqüências únicas e flanqueadas por repetições invertidas<sup>(7)</sup>. O genoma contém aproximadamente 200 genes, que codificam, pelo menos, 35 proteínas estruturais e um número indefinido de proteínas não estruturais. No envelope, que é complexo e pleomórfico, os CMV possuem, pelo menos, 8 glicoproteínas onde se destacam as gB, gH, e, em menores quantidades, as C11 e 48, todas possuindo sítios antigênicos para anticorpos neutralizantes<sup>(6,7)</sup>.

Os CMV podem permanecer latentes no interior de vários órgãos e, eventualmente, produzir doença, por reativação da infecção, quando ocorre rebaixamento da resposta imune celular, principalmente de linfócitos T citotóxicos<sup>(8)</sup>. Infecções por CMV, adquiridas na infância ou na idade adulta, por vias naturais, iatrogênicas ou por transfusões sanguíneas e de seus derivados, são assintomáticas em aproximadamente 90% dos casos. Com o advento das terapias imunossupressoras, utilizadas em tratamentos para as mais diversas neoplasias, bem como nos mais diferentes tipos de transplantes, e, mais recentemente, com a explosão epidêmica da AIDS, os CMV passaram a produzir doenças graves e a assumir grande importância na prática médica. Nos pacientes imunocomprometidos, a citomegalovirose produz quadros clínicos extremamente diversos, variando desde pneumonias intersticiais com disseminação sistêmica do vírus até a rejeição de órgão nos pacientes transplantados<sup>(9,10)</sup>. Nos indivíduos com AIDS, os CMV causam retinite que, se não tratada, frequentemente leva à cegueira bilateral, e que, nessa fase, o quadro é irreversível por seqüela tecidual da retina. Também, causam meningoencefalite, mielite, polirradiculopatias, ventriculoencefalites, mononeurites múltiplas e úlceras em trato digestivo<sup>(11)</sup>. O curso natural da citomegalovirose pode

ser alterado, se medidas terapêuticas forem instituídas precocemente.

Pode-se distinguir indivíduos em pelo menos 3 condições quanto à infecção pelo CMV. Infecção latente, quando o indivíduo apresenta o vírus, mas este não está replicando. Infecção ativa, quando o indivíduo apresenta CMV replicando. Fator necessário para aparecimento de doença, este tipo de infecção é observado em casos agudos por primo-infecção, superinfecção (infecção por mais de um genótipo de CMV) ou reativação de vírus latentes. Citomegalovirose é doença, que costuma ocorrer em indivíduos com infecção ativa, apresentando sinais e/ou sintomas sugestivos, tais como: pneumonia intersticial, doença gastrointestinal, retinite, febre, pancitopenia, leucopenia, trombocitopenia, linfocitose atípica, mialgia, esplenomegalia e artralgia<sup>(12,13)</sup>. Nos indivíduos transplantados de órgãos sólidos e de medula óssea, evidências de replicação viral e sintomas clínicos sugestivos de citomegalovirose como doença costumam ocorrer de um a quatro meses pós-transplante<sup>(14)</sup>.

A altíssima prevalência das infecções por esses vírus, em nosso meio, dificulta a interpretação de testes que detectam a presença de CMV em materiais clínicos, pelo fato de vírus permanecer em estado de latência em polimorfonucleares do sangue; nem sempre é possível implicar o vírus detectado como o agente etiológico da doença presente<sup>(15)</sup>. Assim, é importante o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico em que se detecte a citomegalovirose como doença ou a presença de infecção ativa pelo CMV com replicação viral, sendo um fator indicativo de risco iminente para desenvolvimento de manifestação clínica<sup>(16)</sup>.

A antigenemia de CMV é o primeiro método laboratorial, utilizado rotineiramente, a oferecer parâmetro quantitativo, por determinar proporção de leucócitos infectados no sangue de pacientes. Essa técnica mostra-se útil na prática clínica, principalmente, no seguimento de transplantados; entretanto, exige processamento de material fresco e, quando lida por imunofluorescência, produz resultados subjetivos<sup>(17)</sup>. Nos últimos 15 anos, surge a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e a mesma vem sendo amplamente utilizada na detecção genômica de CMV. A PCR, como método de diagnóstico virológico, nas infecções por CMV, possui sensibilidade superior à do isolamento viral, em cultura celular, e à da antigenemia, conseguindo detectar mais precocemente a infecção por CMV<sup>(18,19)</sup>. A PCR, ainda, possui outras vantagens como a simplicidade de execução, a maior flexibilidade

de com os materiais em teste, permitindo armazená-los a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento, e a possibilidade de repetir os testes em caso de resultados duvidosos devido à utilização de volumes pequenos do material clínico. Entretanto, apesar da detecção viral mostrar-se bastante sensível e específica, existem controvérsias quanto ao uso da PCR qualitativa e sua correlação com infecção ativa ou citomegalovirose como doença<sup>(20)</sup>. O desenvolvimento de métodos quantitativos de CMV mostra-se necessário para a diferenciação das várias formas de apresentação da citomegalovirose<sup>(21)</sup>.

Neste trabalho, objetivamos desenvolver uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) semiquantitativa, simples e de baixo custo, para ser utilizada no diagnóstico da citomegalovirose.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Este método semiquantitativo para CMV baseia-se em um padrão plasmidial quantificado, que é comparado aos teores virais das amostras clínicas dos pacientes. Utilizamos como padrão quantificado um plasmídeo clonado com parte do gene da gB do CMV. Numa segunda etapa, padronizamos o padrão plasmidial quantificado. A técnica é denominada semiquantitativa, porque a quantificação viral, nas amostras clínicas, é obtida indiretamente, por comparação com o padrão plasmidial quantificado.

### 2.1. Clonagem plasmidial

Realizou-se clonagem de seqüência com 296 pares de bases (pb), nucleotídios de 81874 a 82176, correspondentes a parte do gene da gB do genoma de CMV, cepa AD 169, no vetor plasmidial bacteriano pCRII® (Invitrogen, USA). A seqüência clonada foi obtida por PCR, utilizando-se os *primers* gB1 e gB2, mostrados na Tabela I.

Para a PCR, preparou-se mistura de reação contendo 5µl do extrato de DNA da amostra de cultura celular, infectada com CMV, cepa AD 169, 50mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 9), 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ ,

50 µM de cada dNTPs, 0,3 µM do par de *primers* gB1 e gB2 e completando-se para um volume final de 50µl com água tratada em dietilpirocabonato (DEPC). Submeteu-se a mistura à temperatura de  $95^{\circ}\text{C}$ , por 03 min, em ciclador térmico (Techne, Inglaterra) e, logo após, com temperatura reduzida para  $80^{\circ}\text{C}$ , acrescentou-se 1 unidade de Taq DNA polimerase (Gibco, USA). Em seguida, procedeu-se a 35 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 60 seg, a  $55^{\circ}\text{C}$  por 60 seg e a  $72^{\circ}\text{C}$  por 60 seg. Ao final, para visualização do produto amplificado (*amplicon*), realizou-se corrida eletroforética da mistura de PCR em gel de agarose a 2%, utilizando-se azul de bromofenol 0,25% em 40% de sacarose, como marcador. Após coloração do gel em solução de brometo de etídio a 0,5 mg/ml de água e descoramento em água destilada, visualizamos os *amplicons* como bandas, à luz ultravioleta. O tamanho das bandas foi determinado por comparação com marcador para peso molecular com 100 pb (Amersham Pharmacia, USA).

A inserção do *amplicon* foi realizada aleatoriamente, utilizando-se o TA *cloning kit* (Invitrogen, USA) através da incubação do produto da PCR, contendo o *amplicon* com o vetor plasmidial pCR®II, a uma temperatura de  $14^{\circ}\text{C}$ , *overnight*. Esse procedimento seguiu as recomendações do fabricante. Após inserção da seqüência do fragmento de gB no plasmídeo, realizou-se a transformação de bactérias *Escherichia coli*, cepa DH5α. Resumidamente, preparou-se uma mistura de ligação que continha 2µl dos *amplicons* a fresco, 1µl do tampão de ligação (10 vezes concentrado), 2µl do vetor plasmidial pCR®II, 9µl de água estéril e 1µl de DNA ligase T4 (4 U de Weiss). Adicionaram-se 2µl da mistura de ligação a um tubo contendo 50µl de células competentes (*Escherichia coli*) One Shot™ (Invitrogen, USA). Adicionaram-se, também, 2 µl de β-mercaptoetanol 0,5 M e, a seguir, incubou-se o tubo em gelo, por 30 minutos. Em seguida, efetuou-se choque térmico por 30 segundos, colocando-se o tubo em banho a  $42^{\circ}\text{C}$  e, imediatamente, resfriando o mesmo em gelo, por 02 min. Continuando, adicionaram-se 250 µl de meio

SOC, contendo 2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM de dextrose, juntamente com ampicilina 50 µg/ml. Ao final, após incubação rotatória, a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 01 h, a 225 rpm, espalhou-se o conteúdo do tubo em placas de Ágar, contendo meio LB, 50 µg/ml de ampicilina e 40mg/ml de X-gal. O plasmídeo pCR®II

**Tabela I: Primers utilizados na PCR que originou o amplicon clonado, contendo seqüência de nucleotídios do gene de gB de CMV AD 169.**

Primers	Seqüência nucleotídica	Localização no genoma de CMV
gB1	5' GAAACGCGCGGCAATCGG 3'	81874 a 81891
gB2	5' TGGAAGTGGAACTTTGGC3'	82158 a 82176

(Invitrogen, USA) possui genes que conferem resistência à ampicilina e à kanamicina. Portanto, no meio contendo ampicilina multiplicaram-se apenas as bactérias transformadas pelo plasmídio, resistentes a estes antibióticos. Colônias de bactérias transformadas, com coloração branca, foram selecionadas das placas de Petri e transferidas para tubos de ensaio contendo meio LB líquido. Escolheu-se linhagem de bactérias com coloração branca, porque o plasmídio utilizado possui, no local de inserção, o gene da  $\beta$ -galactosidase, enzima que metaboliza a lactose e modifica para cor azul o 5-bromo 4-cloro 3-indolil  $\beta$ -D galactosídio (X-Gal) contido no meio e assimilado pelas bactérias. A presença do produto inserido no plasmídio anula a função deste gene e as colônias adquirem cor branca. As colônias bacterianas clonadas foram expandidas e, conseqüentemente, da mesma forma, os plasmídios contendo o inserto. Em seguida, lisaram-se as colônias bacterianas e os plasmídios foram purificados em colunas de troca iônica Plasmid Mini Kit (Qiagen, USA), seguindo recomendações do fabricante. Na Figura 1, pode-se observar esquema resumido dos passos efetuados na clonagem do vetor plasmidial.

A confirmação da presença do inserto nos plasmídios clonados foi feita, inicialmente, por comparação do tamanho de seus genomas com o de outro plasmídio não contendo inserto, através de eletroforese em gel de agarose a 2%.

## 2.2. Seqüenciamento nucleotídico do produto clonado

Confirmou-se, de forma definitiva, a origem viral do inserto plasmidial por seqüenciamento nucleotídico e a comparação da seqüência com aquela do genoma de CMV. Para tanto, realizou-se PCR de seqüenciamento, utilizando-se o *kit* Thermo seqüenase (Amersham Pharmacia, USA) e os *primers* M13 do plasmídio pCR®II (Invitrogen, USA), que se ligam a 141 bases, precedendo ao inserto na posição 5' e a 131 nucleotídios na posição 3', sucedendo ao inserto, conforme especificações do fabricante (Amersham Pharmacia, USA). Resumidamente, adicionaram-se 2  $\mu$ l da mistura de nucleotídios (A, C, G e T) contendo nucleotídios terminais conjugados a marcadores fluo-

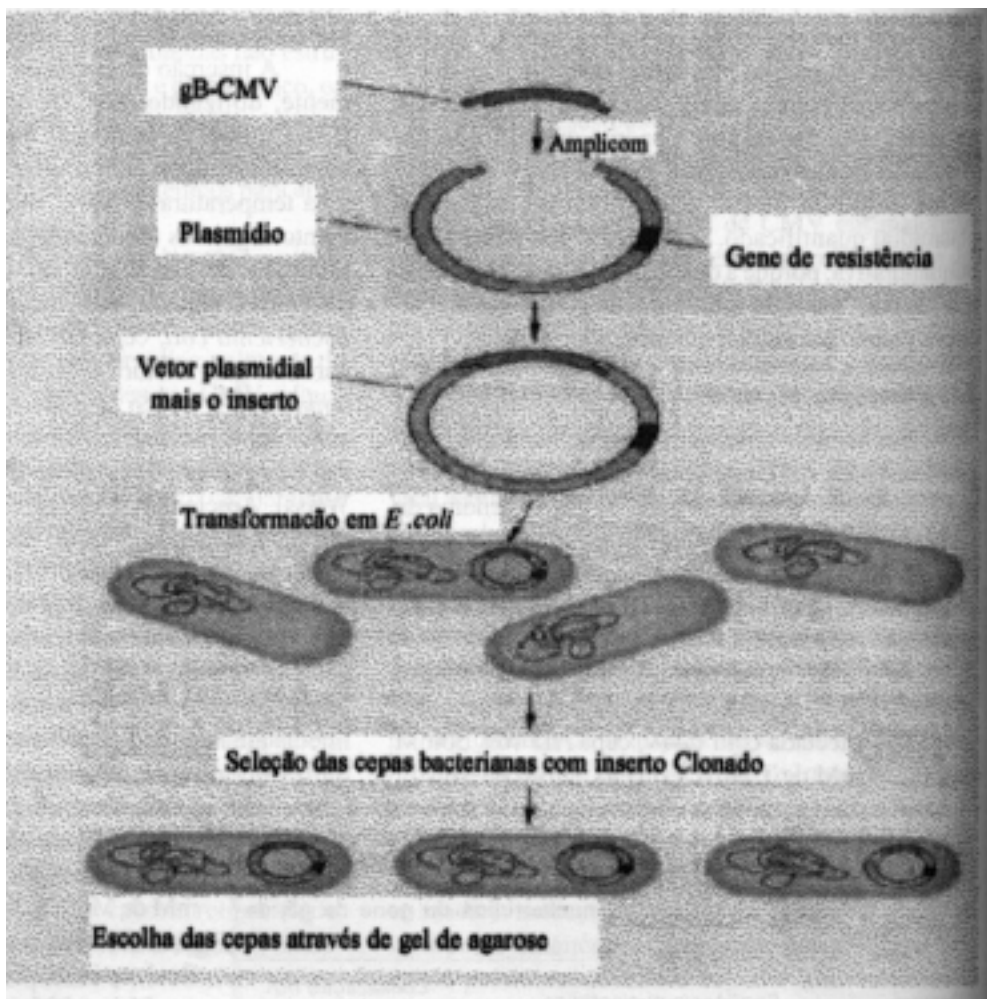


Figura 1: Esquema resumido de clonagem e seleção de vetor plasmidial em *E. coli*.

rescentes. Utilizou-se um tubo para cada um dos 4 nucleotídios terminais, conjugados a marcadores fluorescentes. A cada um dos tubos, adicionou-se mistura contendo: 5 µl do DNA molde (segmento do genoma de gB CMV inserido no plasmídeo), 3.5 µl solução tampão concentrada, 2 µl do *primer* 23-mer (1 µM), 2 µl da enzima Thermo Sequenase (10 U/µl) e água para completar volume final de 27 µl. Transferiram-se 6 µl da mistura para cada um dos tubos marcados. Para minimizar produtos de extensão não específicos, realizou-se pré-aquecimento a 94°C e submeteram-se os tubos a 35 ciclos a 95°C por 30 seg, 60°C por 30 seg e 72°C por 60 seg. A eletroforese de seqüenciamento foi realizada em gel de poliacrilamida a 6%, pré-preparado, polimerizado e carregado com 2 µl de cada amostra, no seqüenciador Seq4x4 (Amersham Pharmacia, Canadá), seguindo especificações do fabricante. A seqüência nucleotídica foi analisada e armazenada em microcomputador, utilizando-se o programa SEQ4x4 Basecaller (Amersham Pharmacia, Canadá) e o programa WinDNAsis (Hitachi, Japão) para análise de homologia por alinhamento nucleotídico da seqüência com a do gene gB do CMV AD169 (Genbank, seqüência M60931).

### 2.3. Quantificação dos plasmídios

Para quantificação, mediu-se a densidade óptica (DO) de extratos puros do plasmídeo clonado em espectrofotômetro GeneQuant II (Pharmacia Biotech, Inglaterra), a uma absorvância de 290 nm. O resultado da medição serviu como base para o cálculo do número de plasmídios.

### 2.4. Preparo da solução plasmidial e sensibilidade de sua detecção pela PCR

Do extrato puro de plasmídeo clonado, foram feitas diluições decimais seriadas, visando a determinar a sensibilidade da PCR com os *primers* gB. Também, igualmente ao que existe nas amostras dos pacientes, acrescentou-se 1µg de DNA humano, extraído de material placentário e negativo para CMV, a cada uma das amostras diluídas testadas na PCR. A PCR foi realizada, utilizando-se mistura de reação semelhante à descrita acima. Fator crítico para a acurácia da medida densitométrica da banda necessária à leitura do teste, padronizou-se o preparo do gel, seu carregamento com os produtos da PCR, a corrida eletroforética e o tratamento do gel para visualização das bandas, de tal maneira que fossem realizados de forma constante.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Purificação do clone plasmidial com inserto

Para selecionar o melhor clone plasmidial contendo o inserto de gene gB do CMV, inicialmente, analisaram-se os plasmídios por eletroforese em gel de agarose a 2%. Detectou-se a presença do inserto nos plasmídios clonados pela comparação do tamanho da banda produzida por seus genomas com a de outro plasmídeo não clonado, conforme mostrado na Figura 2. Plasmídios, contendo o inserto, possuem genomas acrescidos de 296 pb, apresentando, portanto, uma menor velocidade de locomoção por entre os poros do gel. Tal diferença de altura, é discreta, porque o plasmídeo possui 3.948 pb, e o inserto representa apenas 7,49% do tamanho de seu genoma. Selecionaram-se por essa metodologia 22 clones plasmidiais contendo o inserto.

### 3.2. Amplicons de PCR plasmidial

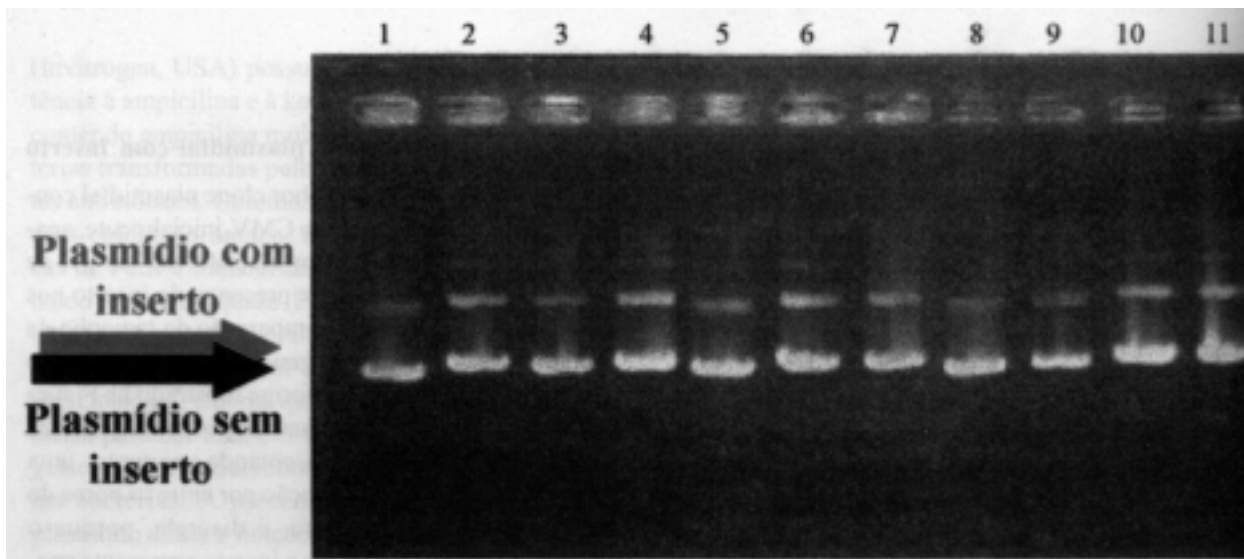
Dos 22 clones plasmidiais selecionados, 3 foram submetidos à PCR com os *primers* gB1 e gB2. Os 3 plasmídios selecionados produziram *amplicons* com 296 pb, confirmando a presença do inserto gB-CMV. O produto da PCR obtido de um dos 3 clones selecionados, pode ser visto na Figura 3, mostra no gel de agarose *amplicon* com 296 pb. Em seguida, os insertos dos 3 plasmídios selecionados tiveram seus nucleotídios seqüenciados.

### 3.3. Seqüenciamento nucleotídico

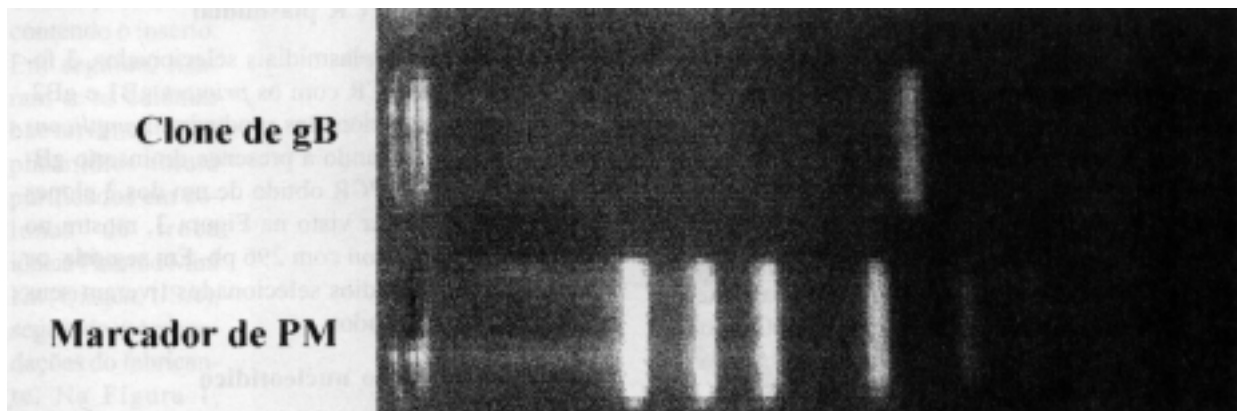
A PCR de seqüenciamento dos 3 plasmídios deu origem a fragmento de 380 pb, incluindo os 296 pb do inserto, flanqueados, de ambos os lados, por seqüências nucleotídicas, pertencentes ao plasmídeo. As seqüências nucleotídicas foram alinhadas com a do gene gB do CMV AD169, mostrando, nos 3 casos, homologia superior a 98% e confirmando a origem viral do inserto, conforme mostrado na Figura 4. Com base no resultado de seqüenciamento, selecionou-se um dos clones para uso na PCR semiquantitativa de CMV.

### 3.4. Cálculo do número de plasmídios

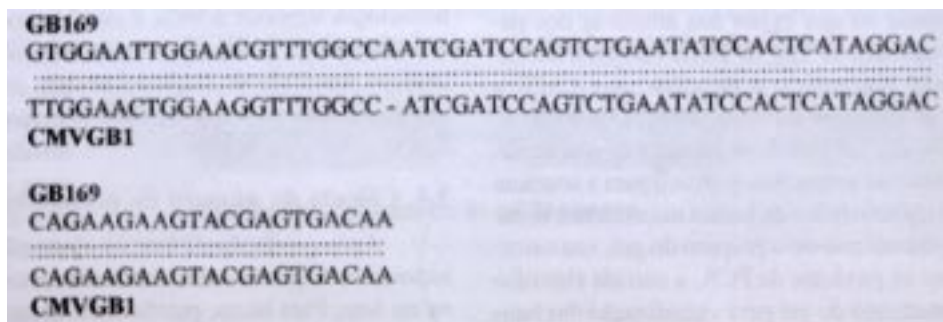
Após produção de lote do clone plasmidial selecionado, determinou-se a concentração de plasmídios no lote. Para tanto, purificaram-se os plasmídios, os quais, num volume de 200 µl, continham 176 µg de DNA / ml.



**Figura 2:** Gel de agarose, mostrando plasmídeo pCRII não clonado (Invitrogen, USA) em 1 e plasmídios com inserto de segmento do gene de gB do CMV cepa AD169, com 296 pb, em colunas 2 a 11.



**Figura 3:** Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio, mostrando, à luz ultravioleta, *amplicon* com 296 pb, oriundo do plasmídeo pCR@II, clonado com gB CMV.



**Figura 4:** Seqüência de nucleotídeos do segmento de gB-CMV clonado, alinhada a fragmento da seqüência conhecida do gene de gB do CMV, mostrando a alta homologia existente entre ambas.

Em seguida, determinou-se o número de plasmídios no lote. Para tanto, utilizou-se o peso molecular (PM) médio de um par de bases nitrogenadas, 660, e multiplicou-se este valor pelo número de pares de bases do plasmídio pCR®II (Invitrogen, USA), contendo o inserto. Determinou-se, dessa forma, que o referido plasmídio possuía PM de 1400190.

Considerando-se que cada 1400190g de material plasmidial conteriam  $6,02 \times 10^{23}$  moléculas plasmidiais (número de Avogadro), determinou-se o número de plasmídios contidos na amostra de concentração 176  $\mu\text{g}$  de DNA / ml. O número de plasmídios contido em nossa amostra foi de  $3,83 \times 10^{18}$  / ml. O lote plasmidial foi aliquoteado em amostras de 50  $\mu\text{l}$ , identificadas e estocadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.5. Sensibilidade da PCR medida por diluição do plasmídio gB-CMV

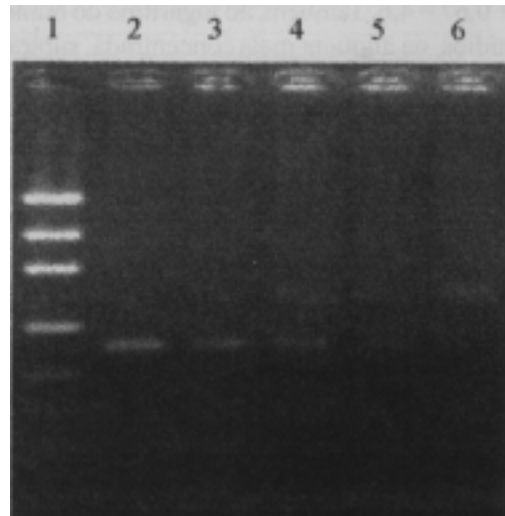
Visando a conhecer a sensibilidade da PCR semiquantitativa de CMV, promoveu-se PCR da amostra plasmidial em diluições decimais. Nesse teste, obteve-se *amplicons* até a diluição, contendo 867 cópias de plasmídios por 5  $\mu\text{l}$  da amostra, como pode ser observado na Figura 5. Também, a sensibilidade da PCR, realizada com os plasmídios isoladamente, mostrou-se igual à das mesmas diluições plasmidiais, acrescidas com 1  $\mu\text{g}$  de DNA humano.

### 3.6. Cálculo da carga de CMV em materiais clínicos

Faz-se o cálculo para determinação da carga de CMV com base na comparação de densidade da banda do *amplicon* do material clínico no gel de agarose com as bandas oriundas de *amplicons* das diluições decimais dos plasmídios clonados com número de partículas conhecidas.

Os *amplicons* dos plasmídios clonados bem como aqueles oriundos de amostras clínicas são fotografados, utilizando-se câmara fotográfica DC 120, zoom digital, câmera (Kodak, USA) com filtro laranja, e analisados em microcomputador através do programa Digital Science 1D (Kodak, USA). Para maior clareza, mostramos os cálculos para determinação da carga de CMV, utilizando um exemplo:

Suponhamos um material clínico com densidade da banda do *amplicon* de 50991. Essa banda situa-se entre bandas da diluição plasmidial com densidade 30307, correspondente a 8670 plasmídios e ou-

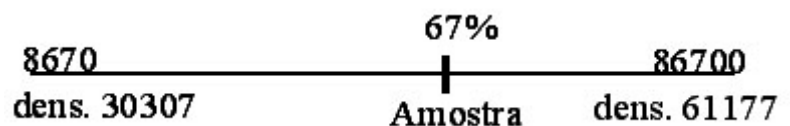


**Figura 5:** Gel de agarose, tratado com brometo de etídio, mostrando, à luz UV, *amplicons* obtidos com diluições plasmidiais decimais e contendo 1  $\mu\text{g}$  de DNA humano. Observa-se na coluna 1, marcador de pares de bases; na coluna 2, solução contendo 867.000 plasmídios; na coluna 3, 86.700 plasmídios, na coluna 4, 8.670 plasmídios e na coluna 5, limite de detecção do *amplicon*, 867 plasmídios. Não se observa banda na coluna 6, contendo 86 plasmídios.

tra com densidade 61177, correspondente a 86700 plasmídios. Assim, para cálculo exato do número de partículas, calcula-se:  $61177 - 30307 = 30870$  (intervalo entre densidades de bandas plasmidiais);  $50991 - 30307 = 20684$  (intervalo entre banda amostral e banda plasmidial mais diluída).

Em seguida, por regra de três, determina-se a proporção correspondente à posição da banda amostral no intervalo entre banda plasmidial menos diluída (0%) e banda plasmidial mais diluída (100%). Este é de 67% como mostrado abaixo.

$$\begin{array}{l} 30870 \longrightarrow \text{100} \\ 20684 \longrightarrow \text{X} \end{array} \quad \Bigg| \quad \text{X} = 67\%$$



Calcula-se o logaritmo do número de plasmídios nas densidades 30307 e 61177, respectivamente  $8670 = 3,93 \log$  e  $86700 = 4,93 \log$ . Ao logaritmo do número de plasmídios na alíquota mais diluída, soma-se a quantidade de 0,67, que corresponde a 67% de 1 log (diferença entre a amostra mais diluída e a menos diluída):

$3,93 + 0,67 = 4,6$ . Também, ao logaritmo do número de plasmídios, na alíquota mais concentrada, subtrai-se o valor de 0,33 que corresponde a 33% de 1 log (diferença entre a amostra mais diluída e a menos diluída):  $4,93 - 0,33 = 4,6$ . Os 2 valores devem ser iguais e seus antilogaritmos correspondem à carga viral. No exemplo, 39 810 partículas de CMV por mg de DNA.

#### 4. DISCUSSÃO

Nos últimos 5 anos, surgiram técnicas semiquantitativas e quantitativas de CMV em materiais clínicos, visando a determinar níveis de vírus (carga viral)<sup>(22)</sup>. Técnicas quantitativas de detecção genômica de CMV por quimioluminescência foram comercializadas em forma de *kits*. Entretanto, apesar de sensíveis e confiáveis, tais *kits* diagnósticos são excessivamente caros, o que impede seu uso rotineiro em países como o Brasil. O método mais recente, utilizado para quantificação de CMV, é a chamada PCR em tempo real, pela qual, utilizando-se sondas marcadas com fluoresceína, pode-se determinar, comparando-se com curva padrão, a quantidade de fluorescência emitida e, assim, determinar a carga viral da amostra clínica<sup>(22)</sup>.

Em nosso trabalho, a seqüência nucleotídica do fragmento genômico da glicoproteína B de CMV, clonado no plasmídio pCR®II, mostrou alta homologia (98%) com a seqüência nucleotídica da cepa AD 169 de CMV. Esse fato permitiu-nos concluir pela indubitável origem viral do inserto e pelo sucesso obtido com a clonagem. A pequena diferença de homologia entre o produto clonado e a cepa AD 169, provavelmente, originou-se por erro durante o processo de extensão da cadeia nucleotídica na PCR pela enzima Taq DNA polimerase, o que produziu deleção de algumas bases nitrogenadas e mutação de outras.

Como parte da padronização da PCR, visando a simular condição semelhante à das amostras clínicas, acrescentamos 1 µg de DNA placentário, humano, negativo para CMV, a cada amostra de plasmídio-controle e comparamos resultados da amplificação genômica pela PCR com os de outras amostras do mesmo plasmídio sem o acréscimo de DNA placentário. Não observamos diferença na sensibilidade da PCR, adicionando-se ou não DNA humano. Nossa observação difere daquela de Kulski<sup>(23)</sup>, que, na padronização de uma técnica de PCR para quantificar CMV, descreveu correlação indireta entre quantidade de DNA placentário, adicionado à amostra plasmidial e sensibilidade da PCR.

A leitura das densidades das bandas eletroforéticas, oriundas de *amplicons* obtidos pela PCR das amostras clínicas, bem como dos plasmídios-controle, é ponto crítico nessa técnica de PCR semiquantitativa para CMV. Por isso, padronizamos e mantivemos constantes: a concentração de agarose bem como a espessura dos géis de eletroforese; a concentração da solução-tampão usada na eletroforese, a quantidade do produto de PCR inserido no gel, o tempo e a voltagem da corrida eletroforética, a solução de brometo de etídio e o tempo de tratamento do gel na solução, bem como o tempo subsequente de descoloramento em água destilada. A obtenção das fotografias digitalizadas dos géis, bem como a análise das bandas eletroforéticas por microcomputador, foram efetuadas sempre se utilizando os mesmos equipamentos e os mesmos parâmetros. Também, os cálculos efetuados para a quantificação dos plasmídios clonados, com base no número de Avogadro e os cálculos das cargas virais, com base na densidade das bandas, foram efetuados de maneira adequada e lógica. Assim, acreditamos ter obtido uma metodologia confiável e reprodutível para determinação da densidade das bandas, quantidades de *amplicons* obtidos e conseqüentemente das quantidades do genoma viral em amostras clínicas.

Diferentes autores mostraram discrepantes sensibilidades para PCRs semi e quantitativas de CMV por eles desenvolvidas. Toyoda *et al.*<sup>(24)</sup> descrevem técnica altamente sensível, capaz de detectar 5 cópias de partículas virais (pv)/µg de DNA total. Caballero *et al.*<sup>(20)</sup>, descrevem uma técnica semiquantitativa de PCR para CMV com sensibilidade muito inferior àquela observada por Toyoda *et al.*<sup>(24)</sup> e praticamente igual àquela que obtivemos, 867 pv/µg de DNA, ou seja 4800 genomas/ 10<sup>6</sup> leucócitos, considerando que 1 leucócito possui 6 nanogramas de DNA<sup>(20)</sup>. Acreditamos que a sensibilidade da PCR semiquantitativa para CMV por nós desenvolvida, de 867 pv/µg de DNA, mostra-se adequada ao diagnóstico da infecção ativa e da citomegalovirose como doença, que devem cursar com cargas virais superiores à citada<sup>(22)</sup>.

A PCR semiquantitativa, aqui apresentada, tem como vantagem o baixo custo, quando comparada aos kits comerciais. Também, a técnica pode ser considerada rápida, já que tomaria ao todo, 10 horas, desde a extração de DNA do creme leucocitário das amostras do sangue de pacientes até a obtenção da carga de CMV. Pretendemos utilizar tal técnica na detecção da carga de CMV em diferentes tipos de pacientes com suspeita de citomegalovirose.



MARIN LJ; CUNHA AA; AQUINO VH & FIGUEIREDO LTM. Development of a semi-quantitative PCR method using a plasmid cloned with part of the gB gene of cytomegalovirus. **Medicina, Ribeirão Preto**, 35, 85-94, jan/march 2002

**ABSTRACT:** Cytomegalovirus (CMV) infections are highly prevalent in Brazil. CMV is a causative of significant morbidity and mortality in immunodepressed patients including bone marrow and kidney transplanted individuals as well as AIDS patients. The present work shows on the development of a semi-quantitative PCR for determination of CMV load in clinical samples. A 296 nucleotides segment of the gB gene of CMV was inserted into PCR II plasmids (Invitrogen, USA), and these plasmids were transfected into *Escherichia coli*. After confirmation of the presence of the insert and multiplication, the plasmids were quantified in the original sample. Following, a titration of the cloned plasmids was carried out in order to determinate the sensitivity of the semi-quantitative PCR using primers that anneal to the gB gene of CMV. That was 867 plasmid copies/ $\mu\text{g}$  of DNA. The CMV load in the leukocytes of clinical samples was determined after PCR, by comparison of densities of the amplicon bands with those of the quantified cloned plasmid titration. This is a simple and low cost CMV semi-quantitative PCR, and it could be used for detecting viral loads in clinical samples of patients infected with CMV.

**UNITERMS:** Cytomegalovirus. Viral Load. Polymerase Chain Reaction.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - KRECH U. Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. **Bull World Health Organ** 49: 103-106, 1973.
- 2 - ARMSTRONG D; GOLD JWM & DRYJANSKI J. Treatment of infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann Intern Med** 103: 738-743, 1985.
- 3 - DREW WL. "Herpesviridae: Cytomegalovirus". In: BALOWS A; HAUSLER JR WJ & LENNETTE EH. **Laboratory diagnosis of infectious diseases: Principles and practice**. Springer Verlag, New York, v.2, p. 247-260, 1988.
- 4 - SCHOOLEY RT. Cytomegalovirus in the setting of infection with human immunodeficiency virus. **Rev Infect Dis** 12: S809-811, 1990.
- 5 - HUANG ES; CHEN ST & PAGANO JS. Human cytomegalovirus. Purification and characterization of viral DNA. **J Virol** 12: 1473-1481, 1973.
- 6 - CHEE MS; BANKIER AT; BECK S; BOHNI R; BROWN C.M; CERNY R; HORSNELL T; HUTCHISON CA; KOUZARIDES R & MARTIGNETTI JA. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD 169. **Curr Top Microbiol Immunol**.154: 125-169, 1990.
- 7 - MOCARSKI JRES. "Cytomegalovirus and their replication". In: FIELDS DM; KNIPE DM & HOWLEY PM, eds. **Fields virology**. Raven Publishers, Philadelphia, p.2447-2492, 1996.
- 8 - QUINNAM GV; BURNS WH; KIRMANI N; ROOK AH; MANISCHEWITZ JF; JACKSON L; SANTOS GW & SARAL R. HLA restricted cytotoxic T lymphocytes are early immune response and important defense mechanism in cytomegalovirus infection. **Rev Infect Dis** 6: 156-163, 1984.
- 9 - KANJ SS; SHARARA AI; CLAVIEN PA & HAMILTON JD. Cytomegalovirus infection following liver transplantation: review of the literature. **Clin Infect Dis** 22: 537-549, 1996.
- 10 - GRUNDY JE; SUPER M; LUI S; SWENY P & GRIFFITHS PD. The source of cytomegalovirus infection in seropositive renal allograft recipients is frequently the donor kidney. **Transplant Proc** 19: 2126-2128, 1987.
- 11 - McCUTCHAN JÁ. Cytomegalovirus infections of the nervous system in patients with AIDS. **Clin Infect Dis** 20: 747-754, 1995.
- 12 - BRAUN WE & NANKERVIS G. Cytomegalovirus viremia and bacteremia in renal allograft recipients. **N Engl J Med** 299: 1318-1378, 1978.
- 13 - CHOU S. Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus strain from individual organ donors. **J Infect Dis** 160: 11-15, 1989.
- 14 - COSTA SCB. Infecção por citomegalovirus (CMV): Epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Clín Terap** 25:18-28, 1999.
- 15 - RINALDO CR; BLACK PH & HIRSCH MS. Interactions of cytomegalovirus with leukocytes from patients with mononucleosis due to cytomegalovirus. **J Infect Dis** 136: 667-678, 1977.
- 16 - RASMUSSEN L; MORRIS S; ZIPETO D; FESSEL J; WOLITZ R; DOWLING A & MERIGAN TC. Quantitation of human cytomegalovirus DNA from peripheral blood cells of human immunodeficiency virus-infected patients could predict. **J Infect Dis** 171:177-182, 1995.
- 17 - GERNA G; ZIPETO D; PAREA M; RAVELLO MG; SILINI E; PERCIVALLE E; ZAVATTONI M; GROSSI P & MILANESI G.

- Monitoring of human cytomegalovirus infection and ganciclovir treatment in the heart transplant recipients by determination of viremia, antigenemia and DNAemia. **J Infect Dis** **164**: 488-498, 1991.
- 18 - BARBER L; EGAN JJ; LOMAX J; YONAN N; DEIRANIYAAK; TURNER AJ; WOODCOCK AA & FOX AJ. Comparative study of thre PCR assay with antigenemia and serology for the diagnosis of HCMV infection in thoracic transplant recipients. **J Med Virol** **49**: 137-144, 1996.
- 19 - YAMAMOTO AY; PINHATA MMM; PINTO PCG; FIGUEIREDO LTM & JORGE SM. Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate. **Pediatr Infect Dis J** **20**: 188-192, 2001.
- 20 - CABALLERO O; MENEZES CL; COSTA MC; FERNANDES SC; ANACLETO TM; OLIVEIRA RM; VIOTTI EA; TAVORA ER; VILAÇA SS; SABBAGA E; PAULA FJ; VILLA LL & SIMPSON AJG. High sensitive single-step PCR protocol for diagnosis and monitoring of human cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. **J Clin Microbiol** **35**: 3192-3197, 1997.
- 21 - ZIPETOD; REVELLO MG; SILINI E; PAREAM; PERCIVALLE E; ZAVATTONI M; MILANESI G & GERNA G. Development an clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. **J Clin Microbiol** **30**: 527-530, 1992.
- 22 - BOECKH M & BOIVIN G. Quantitation of cytomegalovirus: Methodologic aspects and clinical applications. **Clin Microbiol Rev** **11**: 533-554, 1998.
- 23 - KULSKI JK. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in leukocytes by end-point titration and duplex polymerase chain reaction. **J Virol Methods** **49**: 195-208, 1994.
- 24 - TOYODA M; CARLOS JB; GALERA OA; GALFAYAN K; ZHANG X; SUN Z; CZER LSC & JORDAN SC. Correlation of cytomegalovirus DNA levels with response to antiviral therapy in cardiac and renal allograft recipients. **Transplantation** **63**: 957-963, 1997.

Recebido para publicação em 19/07/2001

Aprovado para publicação em 12/12/2001