

Padronização e determinação da carga viral em indivíduos infectados pelo Vírus da Hepatite B

Halon, ML^{1,2}; Rosetti MLR^{1,2}.

1- Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde; 2- Universidade Luterana do Brasil (ULBRA)

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a hepatite B tornou-se um grave problema de saúde pública, alcançando níveis alarmantes de infectados em todo o mundo. Estima-se que aproximadamente dois bilhões de indivíduos já tenham entrado em contato com o vírus da hepatite B (HBV) e destes, 400 milhões tornem-se crônicos. O mais preocupante em relação à doença, está na capacidade de se tornar uma infecção crônica, podendo evoluir para cirrose e/ou carcinoma hepatocelular. A determinação da carga viral tem importância prognóstica-terapêutica, pois seus níveis podem ser úteis na conduta clínica a ser seguida, tanto no acompanhamento quanto na tomada de decisão em relação a medicação a ser administrada.

OBJETIVO

O presente estudo tem como objetivo a padronização da PCR em Tempo Real e a determinação da carga viral em indivíduos infectados pelo HBV, provenientes de um sistema público de saúde na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

METODOLOGIA

Amostragem:

Até o momento, foram coletados plasmas de 35 pacientes. As entrevistas e coletas foram realizadas no serviço de Infectologia do Hospital Dia (Grupo Hospitalar Conceição). Após a assinatura do TCLE, foram coletados 6mL de sangue em tubos com EDTA. Os plasma foram conservados a -80°C .

Extração de DNA viral:

A extração de DNA viral foi otimizada utilizando o kit de extração por coluna HiYield™ Viral Nucleic Acid Extration (Real Genomics, RBC) com adição de proteinase K (10mg/ml) ao tampão de lise e posterior incubação a 60°C por 15 mim.

PCR em Tempo Real:

Para a construção dos iniciadores/sonda utilizados na reação de PCR em Tempo Real foram alinhadas sequências do genoma total do HBV disponíveis no GenBank (NCBI) com sequencias obtidas de um estudo realizado no estado do Rio Grande do Sul (Becker *et al.*, 2010).

O alinhamento foi realizado com o programa computacional ClustalX e as sequências analisadas com o programa BioEdit. A sequência consenso foi utilizada para o desenho dos iniciadores/sonda (tipo TaqMan® MGB) no programa PrimerExpress (Applied Biosystems). Os iniciadores resultantes foram: HBVQF: 5'- TTG TCC TGG YTA TCG YTG GAT GTG-3' e HBVQR: 5'- GAT GAG GCA TAG CAG CAG GAT G-3', que amplificam um fragmento de 72 pb e a sonda desenhada: 6-FAM TGCGGCGTTTTATCAT MGB NFQ.

Diferentes concentrações de sonda e de iniciadores foram testadas na padronização da metodologia empregada. O limite de detecção foi verificado através de uma diluição seriada de um de plasma com carga viral conhecida (AcroMetrix HBV Panel)

Paralelamente, foi construído um padrão de quantificação para a metodologia. Para isso, um fragmento de 485 pb foi inserido no vetor pUC18 e transformado em *E. coli*.

RESULTADOS

A melhor recuperação de DNA, obtida na extração de ácidos nucleicos, foi evidenciada através da adição de proteinase K (10mg/mL) à etapa de lise celular (Figura 1).



Figura 1: Curva de amplificação correspondente à amostra de DNA extraído com e sem a utilização de proteinase K. Para o teste, utilizou-se uma amostra sabidamente positiva para o vírus HBV. O melhor rendimento de DNA foi com a adição de proteinase K ao tampão de lise (menor Ct).

A PCR em tempo real foi otimizada utilizando as concentrações de 300nM e 250nM de iniciadores e sonda, respectivamente (figuras 2 e 3). As replicatas obtiveram melhor reprodutibilidade com o volume de 9uL de DNA adicionado à reação.



Figura 2: Curva de amplificação da PCR em tempo real utilizando diferentes concentrações de iniciadores: 50nM, 300 nM, e 900nM. As amplificações mais eficientes (menores Cts) foram utilizando 900nM e 300nM, indicadas pela seta preta. Junto a seta vermelha a curva de amplificação da menor concentração de iniciadores (50nM).

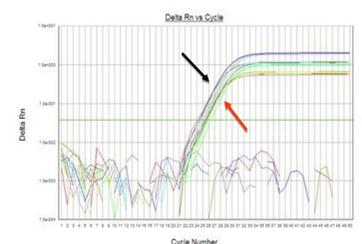


Figura 3: Curva de amplificação da PCR em tempo real utilizando diferentes concentrações de sonda: 50nM, 100nM, 150nM, 200nM e 250nM. A amplificação mais eficiente (menor Ct) foi evidenciada na reação de concentração de 250nM, indicada pela seta preta. Junto a seta vermelha a curva de amplificação da menor concentração de iniciadores utilizada (50nM).

A eficiência da reação foi de 98, 28%, calculada com base em uma diluição seriada de amostra com carga viral sabidamente determinada (Figura 4). O limite de detecção foi de 10UI/mL (dados não mostrados).

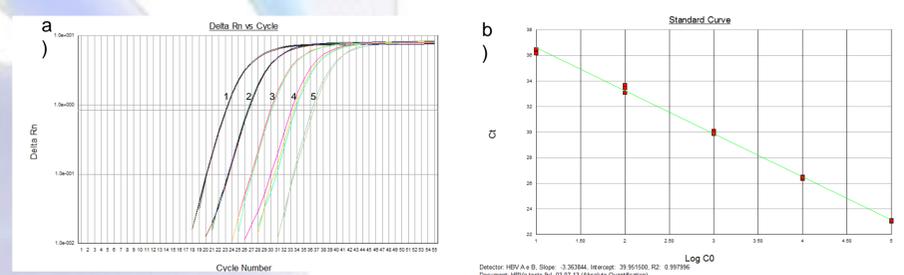


Figura 4: Curva de eficiência de reação. a) Diluição seriada na escala 1:10 de amostra de carga viral conhecida (1: 10.000.000 UI/mL; 2: 1.000.000 UI/mL; 3: 100.000 UI/mL; 4: 10.000 UI/mL; 5: 1000 UI/mL). b) Curva padrão construída a partir da diluição seriada.

Através da padronização realizada, foi possível determinar os valores de carga viral em 22 (62,8%) amostras das 35 amostras analisadas.

CONCLUSÃO e PERSPECTIVAS

Os resultados preliminares demonstram que a técnica mostrou-se sensível e específica. A importância da determinação da carga viral do HBV reside na conduta à terapêutica empregada no tratamento dos pacientes cronicamente infectados com o HBV.

Como perspectivas, pretende-se ampliar o número de pacientes testados e determinar a acurácia da técnica padronizada.