

## Teste PCR em Tempo Real para Diagnóstico *Antemortem* em Humanos e Triagem de High Throughput do Vírus da Raiva\*

### Real Time PCR For Antemortem Diagnosis In Humans and High Throughput Rabies Virus Screening

Zarate-Segura, P<sup>III</sup>; Bastida-Gonzalez, F<sup>I</sup>; Ellison, J<sup>II</sup>; Gallardo-Romero, N<sup>III</sup>; Loparev, V<sup>IV</sup>; Velasco-Villa, A<sup>II</sup>

<sup>I</sup>Instituto Politécnico Nacional, MEX - ESM-UPIBI; <sup>II</sup>Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta USA - Rabies Section; <sup>III</sup>Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta USA - POX Section; <sup>IV</sup>Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta USA - Biotechnology Core Facility

**RESUMO:** a raiva é uma das mais antigas e devastadoras doenças, tipicamente com um índice de mortalidade de 100% dos casos. O diagnóstico da raiva *antemortem* em humanos é importante para definir os procedimentos de controle da infecção e evitar maior exposição das equipes de saúde e de outras pessoas que podem ter tido contato com a saliva do paciente; para determinar epidemiologicamente se outros indivíduos foram expostos à mesma fonte; para monitorar a progressão da doença, mediante intervenções terapêuticas experimentares; para evitar a infecção cruzada durante transplantes de órgãos e, caso negativa, para examinar outros diagnósticos diferenciais. A obtenção de quatro amostras é o recomendado para testes *antemortem* de raiva em humanos (por meio da saliva, do soro, de biópsia de pele da nuca e do fluido cerebrospinal), nos quais os anticorpos, os antígenos virais e os ácidos nucleicos são detectados empregando métodos de neutralização, imunofluorescência direta e indireta e transcrição reversa de PCR. O momento chave para obtenção de resultados conclusivos, nas quatro amostras analisadas por todas as técnicas, é aproximadamente de 24 a 48 horas. A PCR em tempo real parece ser uma técnica promissora para acelerar os resultados da detecção no ácido nucleico e quantificar, com maior precisão, as cargas virais nas amostras dos pacientes. Não existe, porém, *primer* ou *probe* universal que possa detectar a ampla diversidade dos *lissavirus* descrita até o momento, o que reduz drasticamente a sensibilidade do teste. O objetivo deste estudo foi traçar o desenho de um ensaio sensível e específico de PCR em tempo real capaz de detectar e quantificar uma ampla variedade dos vírus de raiva em amostras *antemortem* e *postmortem* em tecidos e fluidos corporais de humanos e animais. **MÉTODOS:** Mais de 2.500 sequências completas de nucleoproteínas de RABV representativas de um espectro global de variantes obtidas das bases de dados do GenBank e do CDC foram analisadas para desenhar 12 conjuntos de *primers* e *probes* amplamente reativos. Dois conjuntos de *primers* e *probes* obtidos da literatura foram também considerados, concomitantemente. Um total de 14 conjuntos foram testados, todos em silicone, com um painel de 20 isolados de vírus (representando uma ampla variedade de RABV em circulação em morcegos e carnívoros em todo o mundo) usando a transcrição reversa PCR em tempo real e ensaios de PCR em tempo real realizados, ambos, em um Light Cycler 480 (Roche, Alemanha) e CFX96 Touch™ Real-Time PCR (Bio-Rad, USA) Detection System para propósitos de comparação. Uma gotícula do sistema de PCR digital QX100 (Bio-Rad Laboratories, Inc) foi usada para avaliar o número de cópias de

\*Trabalho Premiado na Reunião Internacional de Raiva nas Américas (RITA) – Brasil, 2012

*amplicons* por amostra. Para confirmar a detecção os produtos do PCR foram sequenciados e identificados na base de dados do BLAST NVBI. **RESULTADOS:** Os conjuntos de *primers* e *probes* anteriores, obtidos da literatura, tinham sensibilidade limitada, circunscrita aos RABV em circulação em regiões respectivas da Ásia e da África. Nenhum dos conjuntos de *primers* e *probes* que desenhamos foi capaz de, isoladamente, detectar todos os vírus testados. Um pequeno conjunto de cinco *primers* e *probes*, porém, desde que usados concomitantemente em reações separadas, foram capazes de detectar todos os RABV incluídos neste estudo. O sistema foi sensível o suficiente para detectar até cinco cópias de *amplicon*. **CONCLUSÕES:** A PCR em tempo real é uma técnica altamente sensível e específica, porém ainda não existe um único conjunto de *primers* e *probes* amplamente reativos, capaz de detectar toda a diversidade de lissavirus existente. Nós descrevemos cinco conjuntos de *primers* amplamente reativos que foram usados concomitantemente em uma plataforma de 96 poços para detectar todos os RABV notificados globalmente. Esse formato é adequado para o diagnóstico *antemortem* da raiva em humanos e para triagem de grande quantidade de material biológico das amostras obtidas em campo. Pesquisas adicionais em um ensaio quantitativo serão não somente capazes de avaliar o número de cópias de amplicons, mas também de correlacionar com um total estimado do número de partículas viáveis dos vírus.

#### Referência

1. Wacharapluesadee S, *et al.* Expert Rev Mol Diagn. 10(2):207, 2010. Coertse J, *et al.* J Clin Microbiol. 48(11):3949, 2010.