



NESTED-PCR/PCR-ELISA

Alunos: Carlos Guilherme Reis, Roberta Silveira

Professora: Fabiana Seixas

Disciplina: Biologia Molecular

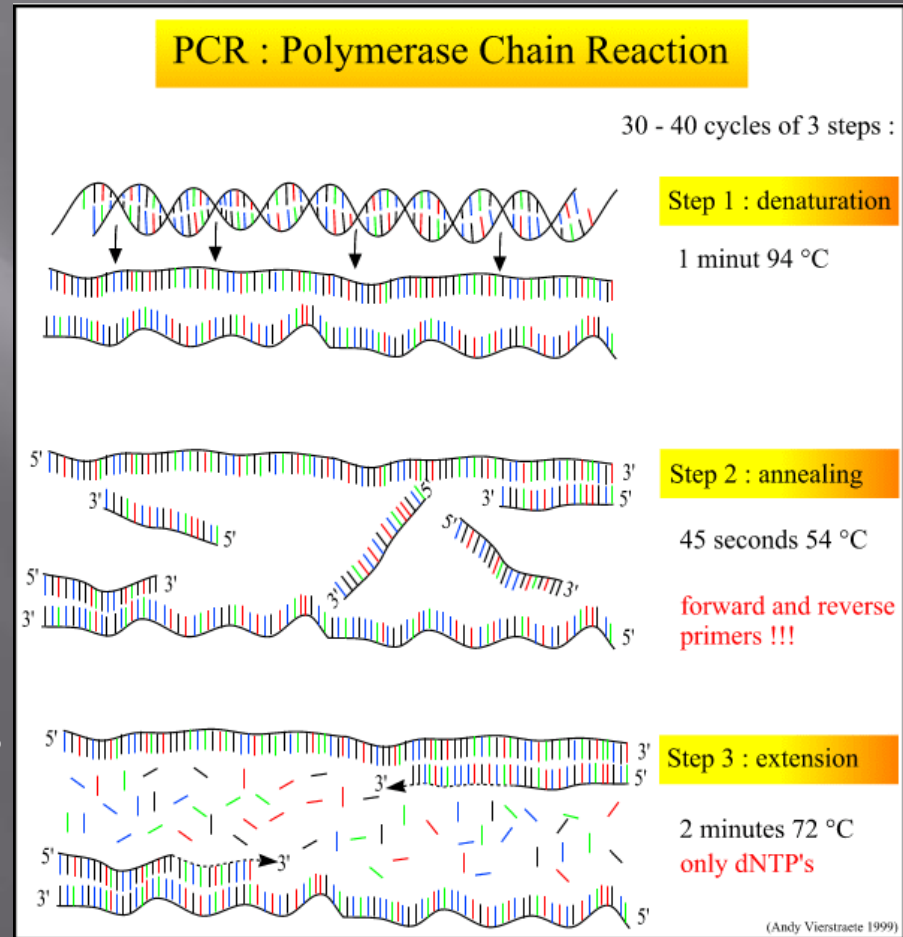
Introdução

- ▣ O que é PCR?
- ▣ Aplicações
- ▣ Técnicas:
 - Nested-PCR e artigos relacionados
 - PCR-Elisa e artigos relacionados
- ▣ Referências
- ▣ Conclusão



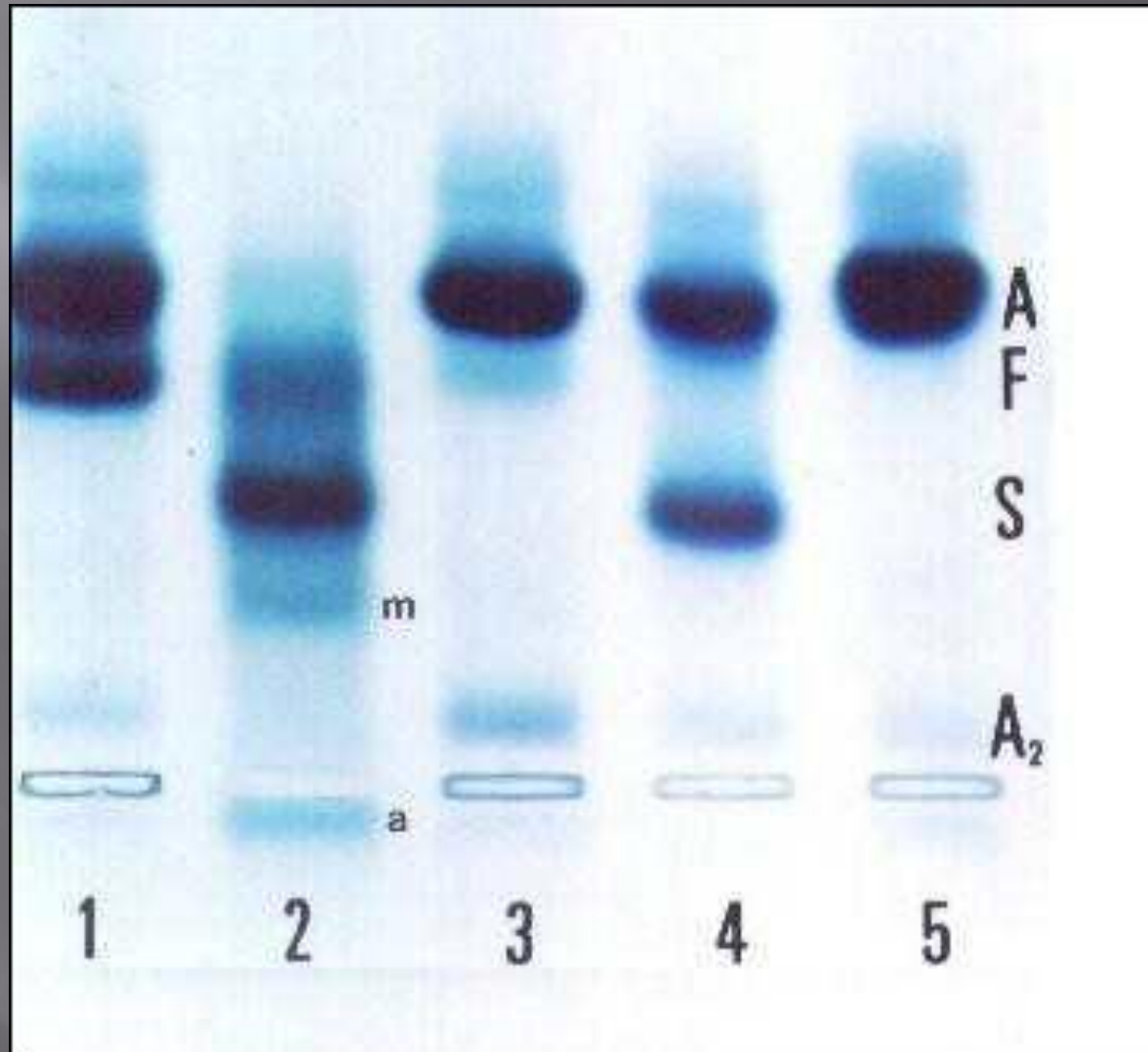
O que é PCR?

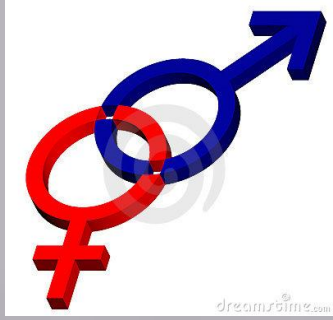
- Polymerase Chain Reaction
- Etapas:
Desnaturação
Anelamento
Extensão
- Amplificação de sequências específicas



PCR: Eletroforese

- ▣ Comparando com marcador conhecido.
- ▣ Pode ou não ser feita.





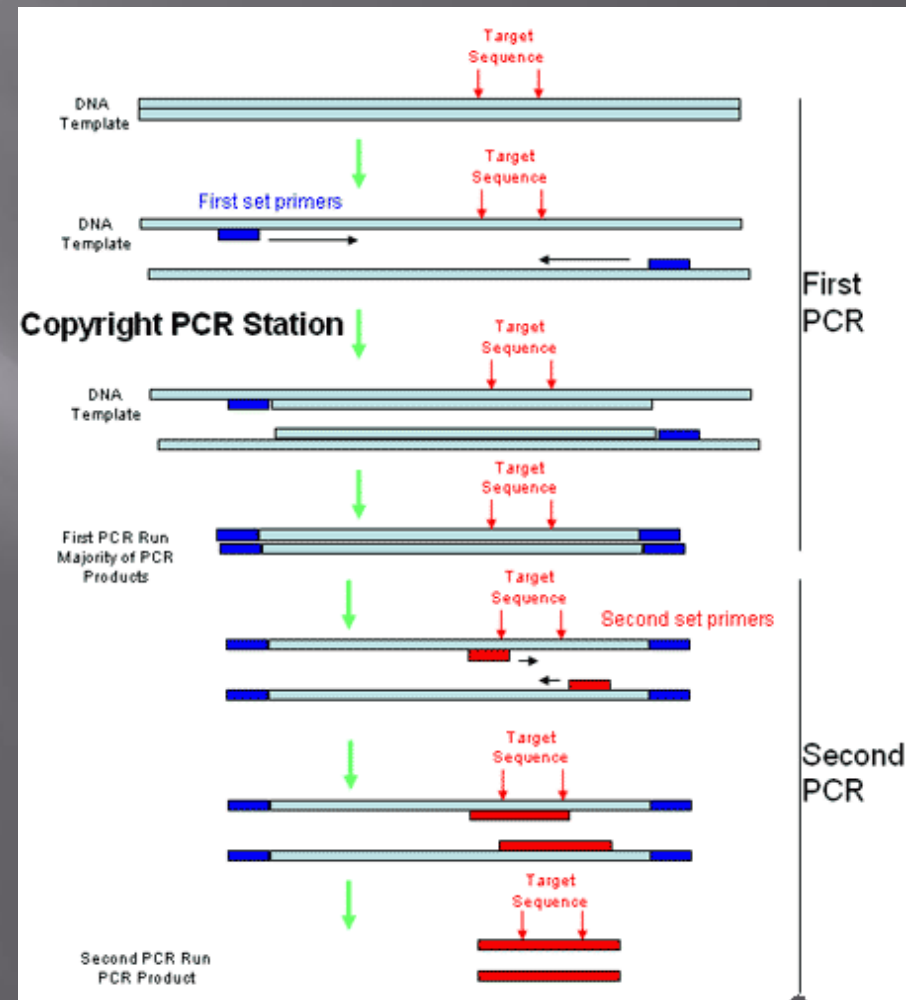
Aplicações

- ▣ Diagnóstico de doenças infecciosas e genéticas
- ▣ Amplificação de genes para posterior clonagem e expressão
- ▣ Determinação de variabilidade genética
- ▣ Detecção de OGMs
- ▣ Sexagem de embriões
- ▣ Estudo da expressão gênica

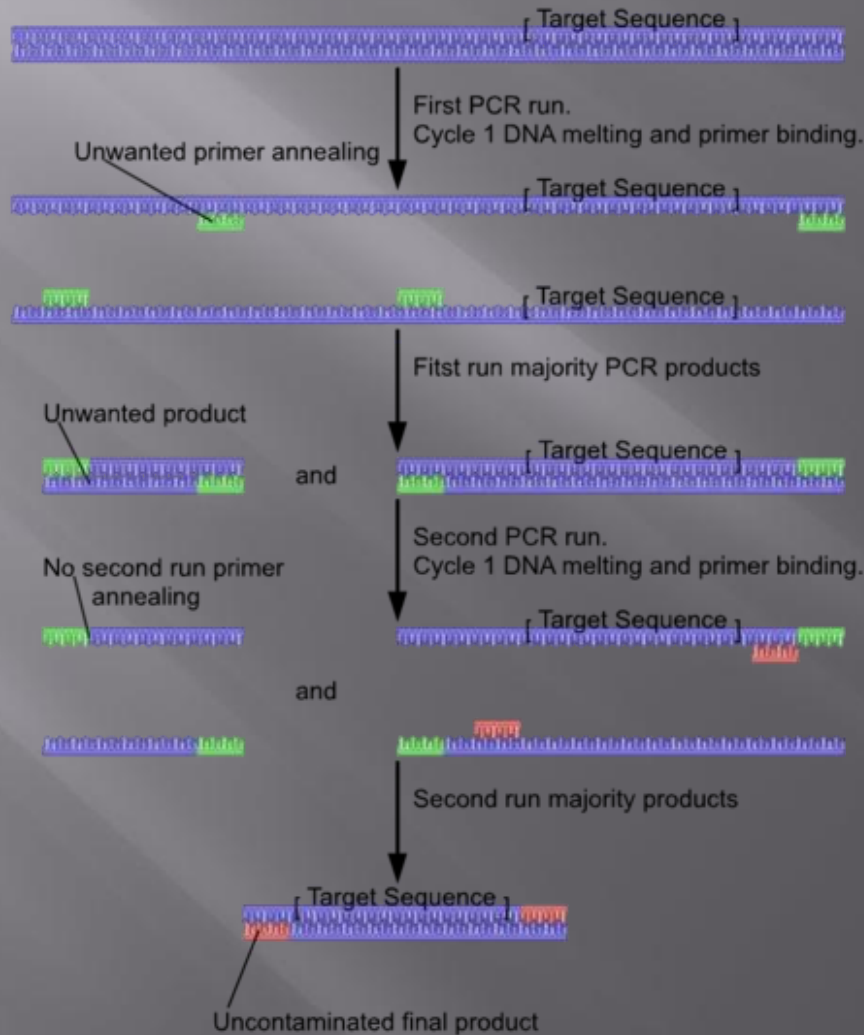


NESTED-PCR

- “Nested”: significado
- 2 etapas
- 2 conjuntos diferentes de primers



NESTED-PCR



NESTED-PCR: PROTOCOLLO

▣ External Round of PCR: Master Mix

*dNTP mix (2mM each dNTP): 5 μ l

*10x PCR buffer (15mM MgCl₂): 5 μ l

*Taq polymerase (0.2U): 0.2 μ l

*dH₂O: 25.8 μ l

*Primer mix. Forward and Reverse primers. (5 pmoles/ μ l each): 4 μ l

*Total Mastermix Volume: 40 μ l

*DNA Template 10 μ l

NESTED-PCR: PROTOCOLLO

▣ Nested PCR Master Mix

dNTP mix (2mM each dNTP): 5 μ l

10x PCR buffer (15mM MgCl₂): 5 μ l

Taq polymerase (0.2U): 0.2 μ l

dH₂O: 35.8 μ l

Primer mix. Forward and Reverse primers. (5 pmoles/ μ l each): 4 μ l

Total Mastermix Volume: 49 μ l

DNA Template (Sample from external round PCR product): 1 μ l

NESTE-PCR: PROTOCOLLO

- ▣ PCR Machine Cycling Parameters
For Both External and Internal PCR Rounds
- ▣ 1 cycle: 94°C/30 sec.
- ▣ 35 cycles: 94°C/30 sec.
55°C/30 sec.
72°C/30 sec. to 120 sec.
- ▣ Hold: 4°C

NESTED-PCR

- ▣ Por que usar?
- ▣ Problema: chances de erro no PCR
- ▣ Aumenta a especificidade, diminuindo a chance do PCR ficar errado
- ▣ Vantagens e Desvantagens





ELSEVIER

International Journal of Antimicrobial Agents 24 (2004) 455–462

INTERNATIONAL JOURNAL OF
**Antimicrobial
Agents**

www.ischemo.org

Significance of nested PCR and quantitative real time PCR for cytomegalovirus detection in renal transplant recipients

Atef Kanaan^a, Isabel Cour^a, Roberto Alvarez-Lafuente^a, Mar Benedicto^a, Esther Culebras^a, Dolores Prats^b, Cristina Fernández^c, Juan J Picazo^{a,*}

^a Department of Microbiology, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Nephrology, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain

^c Department of Preventive Medicine, Hospital Clínico San Carlos, C/ Profesor Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain

Received 5 May 2004; accepted 18 June 2004

Abstract

Immunocompromised renal transplant recipients are susceptible to severe cytomegalovirus (CMV) infection that makes its detection important in clinical practice. A total of 536 blood and 536 serum samples from 67 renal transplant recipients who had previously been diagnosed with terminal renal insufficiency were studied for CMV infection. In all samples, serology, shell vial culture, antigenaemia and nested polymerase chain reaction (PCR) in blood and serum were tested, and a real-time quantitative PCR was run on 90 specimens. Sixty-seven blood donors were used as controls. The results show that the quantitative real-time PCR assay could be of great interest for predicting CMV disease, and to monitor the onset of pre-emptive therapy.

© 2004 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

Keywords: CMV; Nested PCR; Quantitative PCR; Renal transplant

2.7. Nested PCR

The PCR primers used were previously described (2): the sequences of the outer primers were (5'-AGAGTCTGCTCTCCTAGTGT-3') and (5'-CTATCT-CAGACACTGGCTCA-3'); the inner primers consisted of the upstream primer (5'-CCACCCGTGGTGCCAGCTCC-3') and downstream primer (5'-CCCGCTCCTCTG-AGCACCC-3'). Two hundred nanograms of DNA from each sample was amplified in a 50 μ l reaction mixture, which contained (a) for the first round: 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, dATP, dGTP, dCTP and dTTP (400 μ M each), 1.25 U of Taq polymerase, 1 μ M each primer and distilled water to complete the final volume, and (b) for the *nested* PCR, a reaction volume of 50 μ l

contained 5 μ l of the previously amplified product used as a template, deoxynucleoside triphosphates at 200 μ M each, 1 μ M each of the inner primers and 1 U of Taq DNA polymerase and the reaction buffer. The preparations were covered with 150 μ l of mineral oil. A negative control was included to verify the absence of contamination in each reaction using bi-distilled water as a template. For internal positive control, primers were added to the reaction mixture to amplify human β -globin gene to ensure the absence of inhibiting factors as well as the presence of sufficient DNA, throughout the entire amplification procedures. Purified CMV genome (Sigma) was used as an external positive control. Amplification was carried out in a thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus). For the first round, denaturalization was by one 10 min cycle at 94 °C followed by 35 2-min amplification cycles at 94 °C, 1 min 30 s at 65 °C and 1 min at 72 °C. This was followed by one cycle of 7 min 30 s at 72 °C. For the second round PCR, the 35 cycles were performed for 1 min at 94 °C, 30 s at 62 °C and 1 min at 72 °C.

2.9. Detection of the amplified product

Amplified DNA extracts were visualized using 3% agarose gel (BioRad) stained by ethidium bromide and observed under UV light. As well as the samples, a molecular weight marker (DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche Diagnostics) was run in each gel. The product of the first PCR round was 289 bp in size and that of the *nested* PCR round was 162 bp.

Table 2

Concordance of *nested* PCR in serum with the other assays used for diagnosis of CMV infection

Assay A	Assay B	Concordance (%)	Discrepancy (%)		<i>P</i> ^a	κ ^b
			A+/B-	B+/A-		
PCR-serum	Culture	82.3	17.7	0	<0.001	0.29
PCR-serum	IgM	76.7	16.4	6.9	<0.001	0.21
PCR-serum	Antigenaemia	85.5	13.4	1.1	<0.001	0.47

^a Mac Nemar's Test.^b Kappa coefficient.

- ▣ Por que comparar com os resultados do soro?

3. Results

3.1. Prevalence of CMV detection by different assays

When the total number of patients is considered, CMV DNA was detected by *nested* PCR in at least one sample

throughout the follow up in the blood of 65 (97%) transplanted renal recipients and in that of 38 (56%) controls. In serum, CMV DNA was detected in 50 (74.6%) patients and in three (4.5%) controls. There was a significant difference between both groups in blood and serum ($P < 0.001$). When the total number of positive samples was considered, the frequency of CMV DNA detection in blood of 32 patients (65.7%) and 38 controls (56.7%) was similar ($P > 0.05$). Nevertheless, there was a significant difference between the total positive serum samples: 120 (22.4%) for patients and 3 (4.5%) for controls ($P < 0.001$). Prevalence of CMV infection by antigenaemia, culture and detection of CMV-IgG and IgM are shown in Table 1.

- ▣ Grande diferença entre amostras de tipo diferente.

4. Discussion

4.1. Prevalence of CMV DNA detected by nested PCR in total blood and serum

If we consider patients and controls who had at least one positive sample throughout the study, there was a significant difference in detecting CMV DNA in blood and serum. This would suggest an active infection in at least some patients since more positivity was detected in patients than controls. But when the total number of positive samples was considered, the finding of a significant difference between the total positive serum samples of patients and controls and not between their total blood positive samples confirms that detection of DNA in serum could be used as a marker for active infection. This also confirms that applying PCR to blood samples is not suitable for diagnosis of active CMV infection because CMV remains latent in the leukocytes of healthy adults [12]. This is particularly important in clinical practice since detection of active infection could allow patients to begin therapy before symptoms appear. Gerna et al. [13] reported that the majority of reinfections and reactivations by CMV after transplant are often asymptomatic.



ELSEVIER



www.elsevierhealth.com/journals/trst

Multiplex nested PCR for Brazilian *Alphavirus* diagnosis

Roberta V.M. Bronzoni^a, Marcos L. Moreli^a, Ana Cecília R. Cruz^b,
Luiz Tadeu M. Figueiredo^{a,*}

^a *Virus Research Unit, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil*

^b *Arbovirus Laboratory, Evandro Chagas Institute, Belém, PA, Brazil*

Received 21 May 2003; received in revised form 9 September 2003; accepted 16 September 2003

KEYWORDS

Alphavirus;
Reverse transcriptase
PCR;
Multiplex nested PCR;
Brazil

Summary A reverse-transcriptase PCR (RT–PCR) and a multiplex nested PCR were developed for the rapid detection and identification of 14 Brazilian alphaviruses. Using *Alphavirus* genus-specific primers in a RT–PCR, we obtained amplified products of 434 bp. Species-specific primers were selected and simultaneously tested in a multiplex nested PCR. The nested PCR increased the test sensitivity 1000-fold and was capable of identifying Brazilian *Alphavirus* showing the expected bands with diagnostic sizes for Venezuelan (400 bp), Eastern (124 bp), and Western (208 bp) equine encephalitis, Aura (86 bp), and Mayaro (270 bp) viruses. This strategy for diagnosis is fast, sensitive, specific and it can be used as a reliable alternative for routine Brazilian *Alphavirus* diagnosis.

© 2004 Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

▣ Vírus: transmissão, sintomas

2.1. Virus and RNA extraction

Brazilian alphaviruses used in this study are listed in Table 1. *Flavivirus* yellow fever 17D (YF), *Orthobunyavirus* Oropouche BeAn19991 (ORO), *Phlebovirus* Bujaru BeAn47693 (BUJ), and uninfected mouse brain tissue extracts were used as

Table 1 Brazilian alphaviruses used in the study

Virus	Strain
Venezuelan equine encephalitis (VEE)	BeAr 40403 ^a
	78V 3531
	Mucambo (MUC) BeAn 8
	MUC BeAn 10967
	MUC BeAn 484223
Eastern equine encephalitis (EEE)	Pixuna (PIX) BeAr 35645
	SPAn 14723 ^a
	BeAn 7526
	BeAr 126650
Western equine encephalitis (WEE)	BeAn 416361
	Rio 1257 ^a
Aura	BeAn 70100
	BeAr 10315 ^a
Mayaro (MAY)	BeAr 20290 ^a

^aVirus whose nucleotide sequence was used for the selection of species-specific primers.

2.4. Selection of primers for the multiplex nested PCR

Nucleotide sequences obtained from the five *Alphavirus* amplicons, including other published sequences such as VEE 78V 3531, PIX BeAr 35645, and MUC BeAn 8 from VEE complex (Kinney et al., 1998), were aligned using the Clustal W software (Informax, USA) and low homology regions were selected as specific inner primers for VEE, EEE, WEE, Aura, and MAY viruses.

2.5. Multiplex nested PCR

A multiplex nested PCR reaction was carried out in a final volume of 50 μ l and contained 1 μ l (1:50 dilution) of the first amplification reaction, 50 μ M of each dNTP, 1 μ M of each primer (cM3W, nVEE, nEEE, nWEE, nAURA, nMAY), 2.5 units of Platinum *Taq* DNA

polymerase (Invitrogen, USA) in the manufacturer's reaction buffer adjusted to 2 mM MgCl₂. The mixture was then subjected to 25 cycles of 94 °C for 1 min; 53 °C for 1 min; 72 °C for 2 min. A final extension step was carried out at 72 °C for 10 min. Analysis of the amplicons was performed as described above.

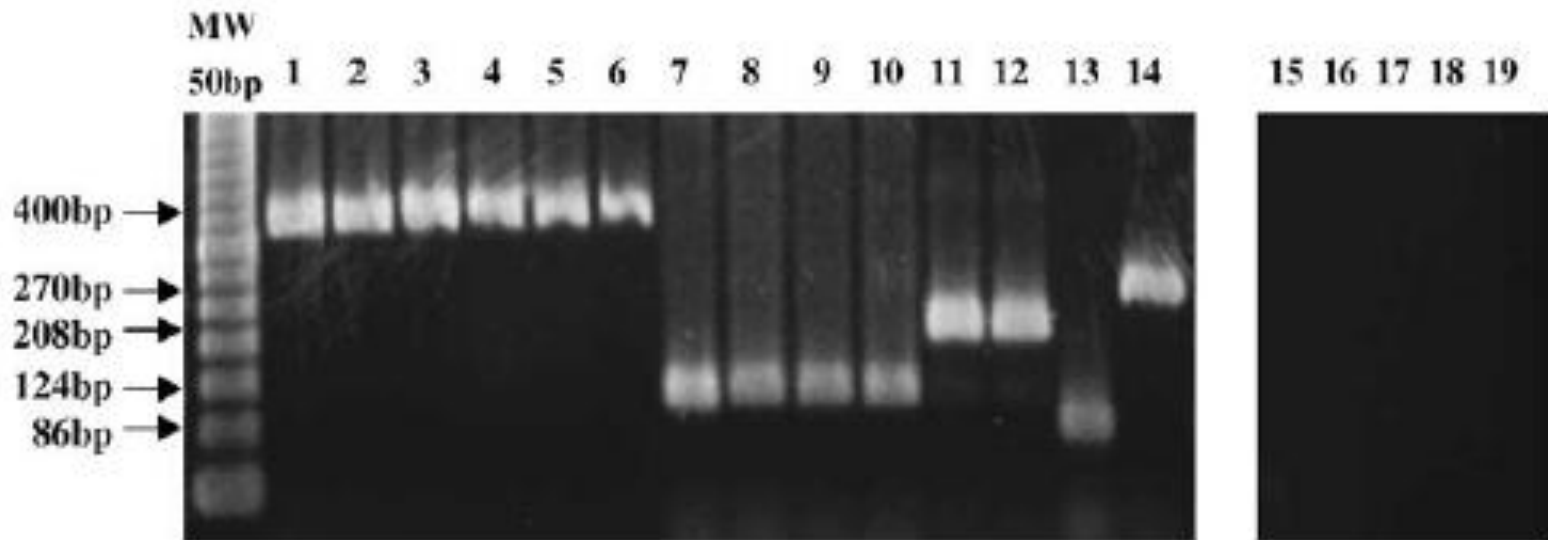
2.6. Determination of sensitivity

The sensitivity of the RT-PCR and of the multiplex nested PCR was determined using a stock seed of MAY (BeAr 20290) having 10^{6.5} TCID₅₀/ml. Serial 10-fold dilutions of this virus were prepared in phosphate-buffered saline (PBS) or in human serum, to mimic viraemic serum samples. The RNA was extracted from each virus dilution and submitted to RT-PCR and multiplex nested PCR as described above.

- ▣ Multiplex: vários primers

Eletroforese

Multiplex nested PCR



4. Discussion

Periodic outbreaks or sporadic *Alphavirus* infection cases of MAY, EEE, WEE, and VEE have been reported in humans and horses in South America, including different regions of Brazil (Figueiredo, 1994). Because alphaviruses have a wide geographic distribution, produce severe diseases without specific clinical symptoms and have an important social and economic impact in these regions, specific and fast diagnostic methods should be useful tools for surveillance of these diseases and control of *Alphavirus* dissemination. Therefore, we developed a strategy for detection of alphaviruses using RT-PCR, followed by a multiplex nested PCR for specific virus identification.

The RT-PCR was based on the study of Pfeffer et al. (1997) that used genus-specific primers for *Alphavirus* detection, modified to use a lower concentration of reagents and a smaller volume of reaction in order to reduce costs. The sensitivity and specificity observed with our test was similar to that reported for the original protocol.

We selected inner primers for identification of the most common Brazilian alphaviruses using a multiplex nested PCR. The assay was able to amplify the genome of all alphaviruses tested. The amplicons, being of different sizes, allowed a simple and specific diagnosis of each virus.

Pfeffer et al. (1997) and Sánchez-Seco et al. (2001) developed a nested PCR using genus-specific primers for alphaviruses. Other authors used species-specific primers for Ockelbo (Hörling et al., 1993) and Ross river (Sellner et al., 1994) viruses. In these studies the nested PCR was only used to confirm and to increase the sensitivity of the PCR. The multiplex nested PCR described in this study has been used for both virus identification at species level and improvement of the sensitivity. The multiplex nested PCR was 1000-fold more sensitive than the RT-PCR and this sensitivity was not changed when the virus RNA was extracted from human serum, thus making this test suitable for use in viraemic individuals. To overcome the risk of contamination when using the nested PCR system, this study was developed by following common sense guidelines: separation of pre- and post-PCR work areas and use of dedicated pipettes.

In short, the strategy of diagnosis using RT-PCR for detection and multiplex nested PCR for virus identification was fast, sensitive, specific and could be used as a reliable alternative for Brazilian *Alphavirus* routine diagnosis and surveillance.

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus

C.L. Kho ^a, M.L. Mohd-Azmi ^b, S.S. Arshad ^b, K. Yusoff ^{a,*}

^a *Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Science and Environmental Studies, Universiti Putra Malaysia, 43400, Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia*

^b *Faculty of Veterinary Medicine, Universiti Putra Malaysia, 43400, Serdang, Selangor Darul Ehsan, Malaysia*

Received 20 September 1999; received in revised form 13 December 1999; accepted 14 December 1999

Abstract

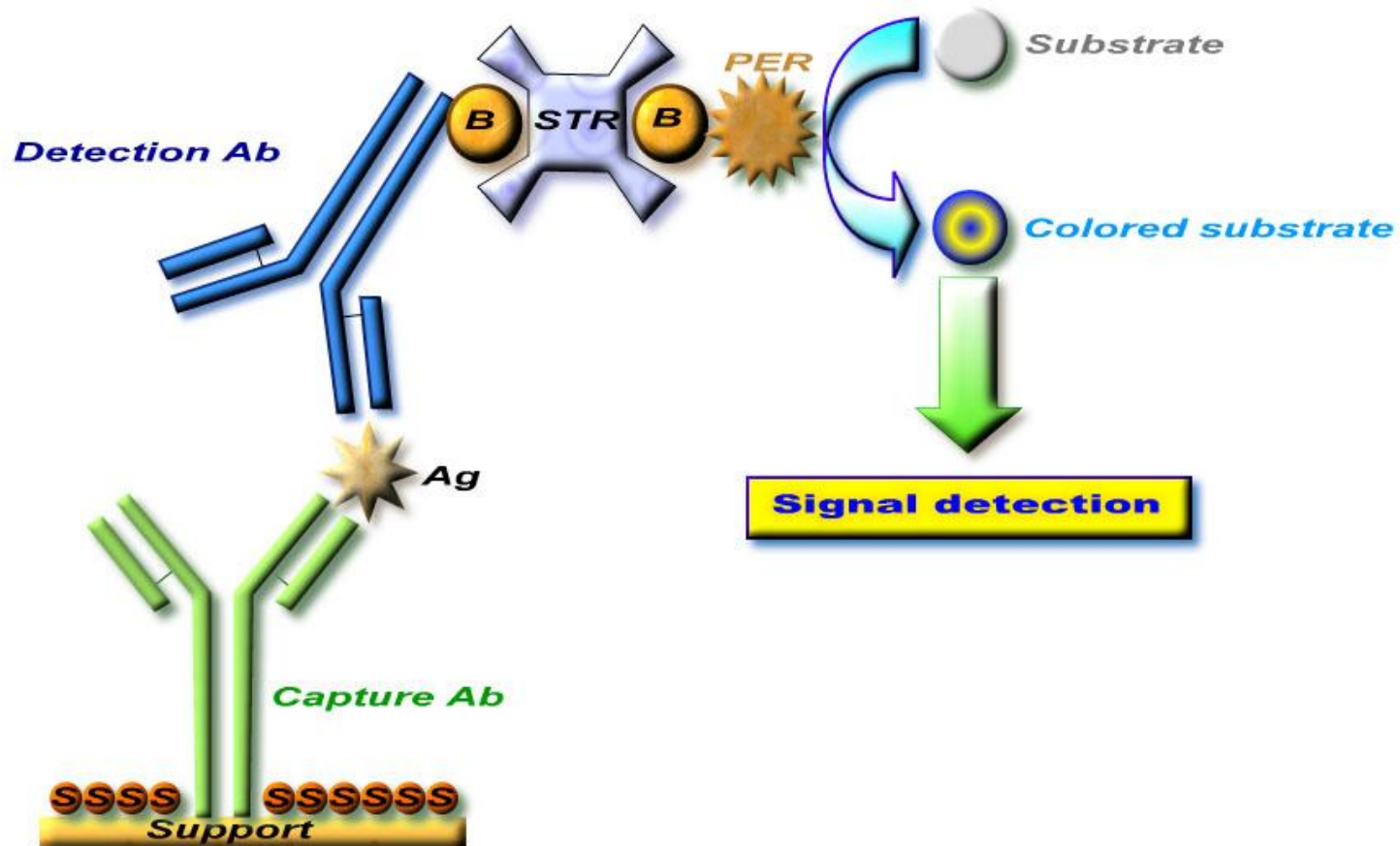
A sensitive and specific RT-nested PCR coupled with an ELISA detection system for detecting Newcastle disease virus is described. Two nested pairs of primer which were highly specific to all the three different pathotypes of NDV were designed from the consensus fusion gene sequence. No cross-reactions with other avian infectious agents such as infectious bronchitis virus, infectious bursal disease virus, influenza virus, and fowl pox virus were observed. Based on agarose electrophoresis detection, the RT-nested PCR was about 100 times more sensitive compared to that of a non-nested RT-PCR. To facilitate the detection of the PCR product, an ELISA detection method was then developed to detect the amplified PCR products and it was shown to be ten times more sensitive than gel electrophoresis. The efficacy of the nested PCR-ELISA was also compared with the conventional NDV detection method (HA test) and non-nested RT-PCR by testing against a total of 35 tissue specimens collected from ND-symptomatic chickens. The RT-nested PCR ELISA found NDV positive in 21 (60%) tissue specimens, while only eight (22.9%) and two (5.7%) out of 35 tissue specimens were tested NDV positive by both the non-nested RT-PCR and conventional HA test, respectively. Due to its high sensitivity for the detection of NDV from tissue specimens, this PCR-ELISA based diagnostic test may be useful for screening large number of samples. © 2000 Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Newcastle disease virus; RT-nested PCR; ELISA-based colourimetric detection method

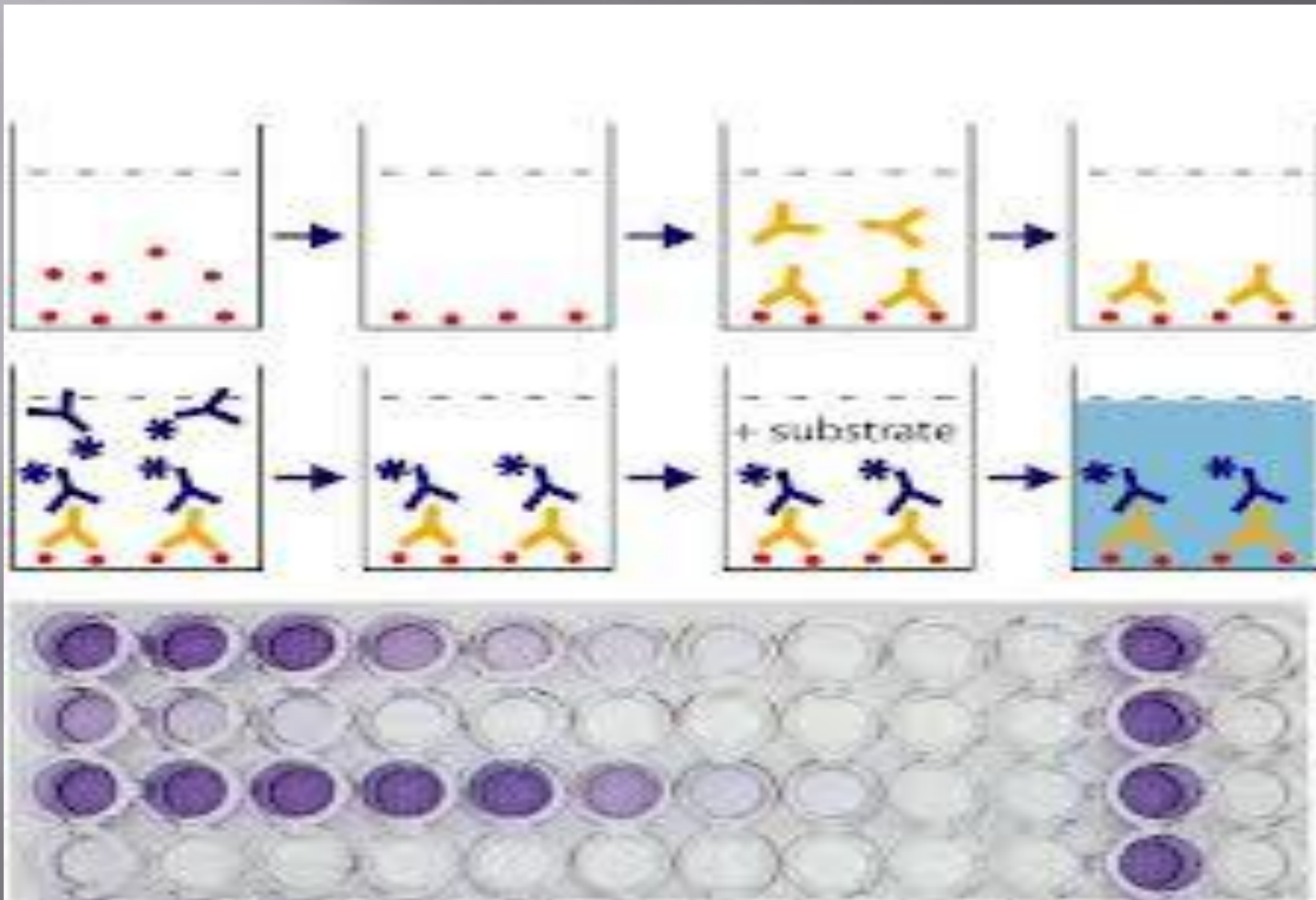
PCR-ELISA: ELISA

- ▣ Teste ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
- ▣ Reações antígeno-anticorpo detectáveis através de reações enzimáticas.
- ▣ Complexo enzima-anticorpo-antígeno resulta em um produto colorido.
- ▣ Métodos: Competitivo, direto, indireto.

PCR-ELISA



PCR-ELISA



ELISA

▣ Equipamentos necessários:

*Placa de Elisa;

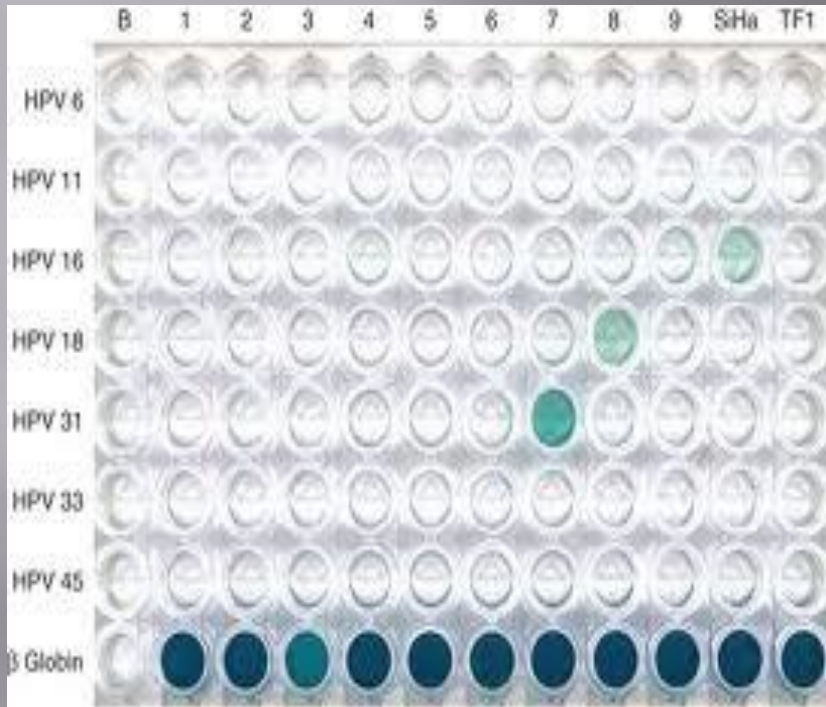
*Micropipetas automáticas;

*Leitores

*Lavador automático de placas;



PCR-ELISA



ELISA

▣ Enzima: Peroxidase

H_2O_2 em $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

▣ Cuidados:

* Estocagem de reagentes e amostras;

* Evitar contaminação e espuma no preparo de soluções;

* Calibração

* Limpeza

PCR-ELISA

▣ Efeito da Estreptavidina/Biotina

*Estreptavidina

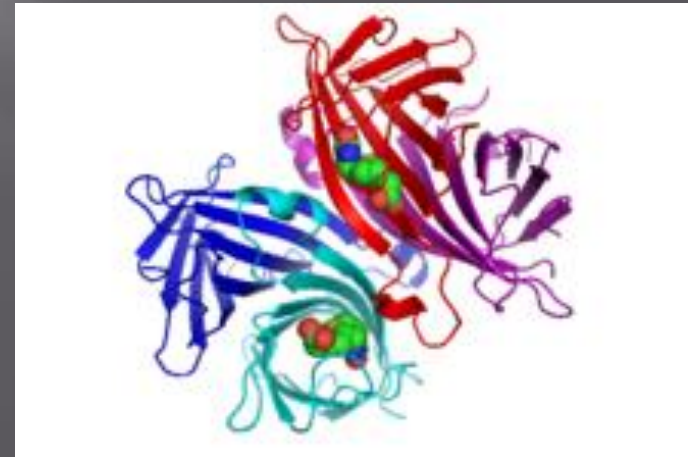
-Proteína trimérica de 60 kDa extraída da bactéria *Streptomyces avidinii*.

-Possui alta afinidade pela Biotina

-Complexo biotina/estreptavidina é muito resistente

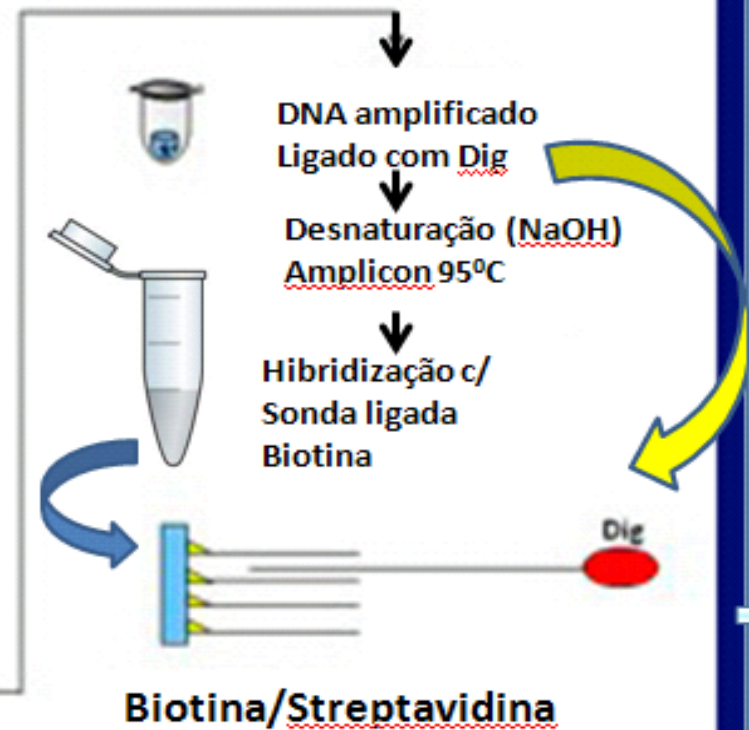
*Biotina (Vitamina H):

Cofator Enzimático.

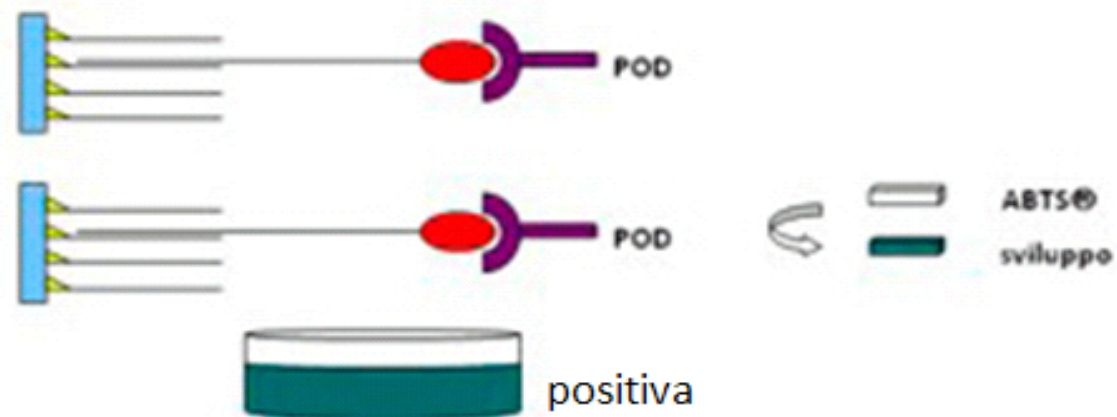


PCR-ELISA

Amostras: soro, plasma, secreções



Lavagens PBS-T
Incubação com **Anti-Dig**
Lavagens PBS-T
substrato colorimétrico
escuro 15 '
Leitura em 405 nm



PCR-ELISA

- ▣ PCR: método molecular.
- ▣ ELISA: método imunológico.

- ▣ O PCR-ELISA detecta micro-organismos com muito mais precisão.
- ▣ Teste por microscopia 63%
- ▣ Testes por PCR 92%
- ▣ Teste PCR-ELISA 94%.

PCR-ELISA

▣ Vantagens:

*Não é preciso correr em gel;

*Não se utiliza brometo de etídio e luz UV.

*Desvantagens:

*Em baixa escala é de alto valor.



PCR-ELISA

The application of PCR-ELISA to the detection of *Trypanosoma brucei* and *T. vivax* infections in livestock

R.A. Masake, J.T. Njuguna, C.C. Brown¹, P.A.O. Majiwa*

International Livestock Research Institute (ILRI), P.O. Box 30709, Nairobi, Kenya

Received 29 June 2001; received in revised form 17 December 2001; accepted 11 January 2002

Abstract

Teneral tsetse flies infected with either *Trypanosoma brucei* or *T. vivax* were fed on healthy cattle. Blood samples collected daily from the cattle were examined by microscopy for the presence of trypanosomes, in thick smear, thin smear and in the buffy coat (BC). All the cattle fed upon by infected tsetse developed a fluctuating parasitaemia. DNA was extracted from the blood of these cattle and subjected to polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotide primers specific for *T. brucei* or *T. vivax*. The PCR products unique to either *T. brucei* or *T. vivax* were identified following amplification of DNA from the blood samples of infected cattle, whereas none was detectable in the DNA from the blood of the cattle exposed to non-infected teneral tsetse. In a concurrent set of experiments, one of the oligonucleotide primers in each pair was biotinylated for use in PCR-ELISA to examine all the blood samples with this assay. Both the PCR and the PCR-ELISA revealed trypanosome DNA in 85% of blood samples serially collected from the cattle experimentally infected with *T. brucei*. In contrast, the parasitological assays showed trypanosomes in only 21% of the samples. In the blood samples from cattle experimentally infected with *T. vivax*, PCR and PCR-ELISA revealed trypanosome DNA in 93 and 94%, respectively. Microscopy revealed parasites in only 63% of the BCs prepared from these cattle. Neither PCR nor PCR-ELISA detected any trypanosome DNA in blood samples collected from the animals in the trypanosome-free areas. However, both assays revealed the presence of trypanosome DNA in a number of blood samples from cattle in trypanosomosis-endemic areas. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

2.3. ELISA detection of PCR products

To control for the specificity of PCR–ELISAs, PCR products of *T. congolense*, *T. brucei* and *T. vivax*, all obtained under identical conditions, were applied into the wells of microtitre plates previously coated with streptavidin. In these experiments the DNA of *T. vivax* and *T. congolense* served as negative controls for *T. brucei* DNA, and the DNA of *T. brucei* and *T. congolense* served as negative controls for *T. vivax* DNA. The PCR products were hybridized with either *T. vivax*- or *T. brucei*-specific oligonucleotide probes linked to fluorescein.

The ELISA was performed in microtitre plates (Maxisorp, F96) coated with streptavidin (1 µg/ml) diluted in carbonate coating buffer (35 mM sodium hydrogen carbonate; 15 mM sodium carbonate; pH 9.6) at 100 µl/well (Nutman et al., 1994). The plates were shaken briefly after addition of the coating buffer, incubated at room temperature for 2 h, and then stored at 4 °C for up to 1 week after removal of the buffer. Prior to use, wells of the microtitre plates were washed six times with Tris-buffered saline (TBS: 137 mM NaCl, 2.3 mM KCl, 25 mM Tris–base, pH 7.4), and then rinsed briefly with TBS alone to remove traces of Tween-20. The PCR products to be analyzed by ELISA were diluted 1:10 with hybridization buffer (6 × SSPE (0.9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄·H₂O, 6 mM EDTA); 5 × Denhardt's solution (1 g each of ficoll, polyvinyl pyrrolidone and bovine serum albumin per liter of water); 0.1% sodium sarcosine; 0.02% sodium dodecyl sulfate). Subsequently, 100 µl of each sample was dispensed into each well and incubated at 37 °C for 1 h to facilitate the binding of the biotinylated PCR products to the streptavidin coating in the wells of the plate. The microtitre plate was subsequently washed six times with TBS containing Tween-20. The PCR products attached to the plate were denatured by adding 200 µl of 1 N NaOH in each well and incubating for 2 min at room temperature. The unbound PCR products were removed by washing the plates six times with TBS/Tween-20. Subsequently, 100 µl of fluorescein-labeled oligonucleotide probe (at 1 ng/ml) in hybridization buffer was added into each well and the plate incubated at 55 °C for 2 h. The wells were washed twice with 0.05 × SSPE, 0.1% BSA at 55 °C, and then further rinsed six times with TBS/Tween-20. The fluorescein-labeled probe was revealed by introducing into each well 100 µl of anti-fluorescein antibody conjugated to alkaline phosphatase, diluted in TBS/1% BSA. The reaction proceeded at 37 °C for 30 min. The plates were washed as before in TBS/Tween-20 prior to addition of 100 µl/well of

Table 1

Outcome of tests performed on blood samples from cattle experimentally infected with *T. vivax* and from uninfected cattle and sheep

Animal number	Number of sample	Parasitaemia	PCR	PCR-ELISA
BN 373	39	26	33	34
BN 374	40	20	34	34
BN 375	38	27	32	32
BN 376	3	2	3	3
BN 377	4	3	4	4
BN 378	40	22	34	34
BN 379	40	27	34	34
BN 380	39	14	31	31
BN 381	39	24	31	32
BN 382	37	15	30	30
Total	285	180 (63%)	266 (93%)	268 (94%)
BN 384	30	0	0	0
BN 385	30	0	0	0
Debra Zeit	192	0	0	0
Debra Barhan (sheep)	51	0	0	0
Total	303	0	0	0

Table 2

Outcome of tests performed on blood samples collected from cattle experimentally infected with *T. brucei* and from uninfected cattle

Animal number	Number of sample	Parasitaemia	PCR	PCR-ELISA
BP 308	61	15	51	51
BP 309	61	17	52	52
BP 310	61	12	52	52
BP 311	61	10	52	52
BP 312	61	15	52	52
BP 313	61	15	52	52
BP 314	61	16	52	52
BP 315	61	10	52	52
BP 316	61	11	52	52
BP 317	61	22	54	54
BP 318	61	5	50	50
BP 319	61	7	51	51
BP 320	61	9	51	51
BP 321	61	19	52	52
BP 322	61	9	51	51
Total	915	192 (21%)	776 (85%)	776 (85%)

Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste

Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test

Nina M. G. P. de Queiroz¹; Juliana de Assis¹; Trícia M. F. S. Oliveira²; Rosângela Z. Machado²; Cárís M. Nunes³; Wilma A. Starke-Buzetti^{1*}

¹Departamento de Biologia e Zootecnia, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista – UNESP

²Departamento de Patologia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – UNESP

³Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – UNESP

Recebido em 22 de Abril de 2009

Aceito em 16 de Junho de 2009

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar as técnicas de imunistoquímica (IMIQ) e de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tecidos cutâneos para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e compará-los com os exames parasitológicos em tecidos corados histoquimicamente (hematoxilina-eosina, HE) e com testes sorológicos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ensaio imunoenzimático (ELISA). Dos 34 cães naturalmente infectados, classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e polissintomáticos, foram coletadas amostras de pele sadia ou com lesão para a realização da IMIQ, HE e PCR. Não somente pelas lesionadas (56,5%), mas também sadias (31,8%) encontravam-se positivas pela IMIQ, confirmadas posteriormente pela PCR em 97,8% das amostras. No grupo assintomático, 87,5% estavam negativos pelos testes sorológicos, mas positivos em 50% dos casos pela IMIQ e 100% pela PCR. Entre os oligossintomáticos, 100%, 85,7% e 28,6% encontravam-se positivos, respectivamente, pela PCR, sorologia e IMIQ. Os cães polissintomáticos eram 91,7% soropositivos e tinham parasitas na pele. Em geral, a técnica PCR teve maior positividade (100%). A eficiência dos testes variou de acordo com a evolução da doença, demonstrando a necessidade da associação de técnicas, usando-se IMIQ para confirmação da sorologia e a PCR apenas nos casos suspeitos após a IMIQ. Dessa forma, pode-se aumentar os níveis de positividade e contribuir para o controle desta zoonose.

Introdução

A Leishmaniose Visceral (LV) é um grave problema de saúde pública mundial, causada no Brasil por um protozoário da espécie *Leishmania (L.) chagasi*, transmitida por insetos vetores, que afetam homens, animais domésticos e silvestres na maioria das regiões brasileiras (BRASIL, 2003). Os cães são os reservatórios mais importantes do parasita, em área urbana, por causa da sua relação de proximidade com os homens (DEANE, L. M.; DEANE, M. P., 1955). A pele dos cães tem três aspectos importantes para a LV: é a região do corpo que mais manifesta os sinais clínicos, é o local onde acontece a primeira interação entre o parasita e o sistema imune do cão, além de ser o local onde se encontra grandes quantidades de formas amastigotas do parasita (CIARAMELLA et al., 1997).

As lesões de pele, como a alopecia e as dermatites, são comuns na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) (SOLANO-GALLEGO et al., 2004; ORDEIX et al., 2005). No entanto, a maioria dos cães infectados não apresenta sinal clínico (CABRAL et al., 1998) e mesmo na pele clinicamente sadia pode haver a presença de parasitas, o que alerta para a importância desses animais no ciclo de transmissão da doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

No Brasil, as estratégias de controle da doença estão baseadas no diagnóstico e tratamento precoce de casos humanos, no controle dos vetores por meio do uso de inseticidas e na detecção dos cães infectados por análises parasitológicas e sorológicas (Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI e ensaio imunoenzimático – ELISA) com posterior eutanásia dos animais positivos (BRASIL, 2003). Enquanto os testes sorológicos apresentam mais resultados falso positivos por causa das reações cruzadas com outros patógenos (BADARÓ et al., 1983; INIESTA et al., 2002), os métodos parasitológicos são mais precisos, mas também mais invasivos porque, usualmente, requerem punção de linfonodo periférico ou medula óssea.

A detecção de *Leishmania sp.* pela biópsia de pele é uma ferramenta alternativa para o diagnóstico. Entretanto, exames

(kit Bio-Manguinhos), foram encaminhados ao Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Ilha Solteira, SP, para serem eutanasiados em cumprimento ao Decreto nº. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963. Esses animais (idade adulta, sem raça definida e de ambos o sexos) foram doados para a presente pesquisa e deles coletaram-se amostras de sangue, de pele sadia (sem alterações macroscópicas) e de pele com lesão.

2. Formação dos grupos de cães

Antes e durante as necropsias, os animais foram examinados quanto aos sinais clínicos mais evidentes para LVC. Assim, os cães foram separados em três grupos: oito cães assintomáticos (sem sinais clínicos), 14 cães oligossintomáticos (até três sinais clínicos ou comprometimento de até três órgãos) e 12 cães polissintomáticos (mais de três sinais clínicos ou com mais de três órgãos acometidos). Adicionalmente, durante as necropsias, fragmentos de fígado, baço e linfonodo foram coletados para realização de *in print* de órgãos para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania sp.*, que confirmou a Leishmaniose Visceral.

3. Exames parasitológicos (HE e IMIQ)

No grupo dos cães oligossintomáticos, as amostras de pele foram coletadas de áreas com lesão e sem lesão macroscópica do mesmo cão, na maioria deles. Dessa forma, coletaram-se 22 amostras de pele sadia (oito cães assintomáticos e 14 cães oligossintomáticos) e 23 de pele com lesão (12 cães polissintomáticos e 11 oligossintomáticos). As amostras de pele com lesão foram coletadas principalmente dos locais onde as lesões estavam mais evidentes e, as peles sadias, preferencialmente do focinho e ponta da orelha. Essas amostras foram, inicialmente, fixadas em formalina tamponada a 10%, lavadas três vezes em álcool 70 °C e deixadas no álcool até a utilização pelas técnicas histoquímica e imunoistoquímica.

Na técnica de histoquímica (HE), os tecidos fixados foram

6. Análise estatística

Para avaliar a concordância entre os diferentes métodos de diagnóstico, calculou-se o índice Kappa (κ) de concordância (intervalo de confiança 95%), usando-se o programa Biostat, versão 4.0 (AYRES et al., 2005), sendo $\kappa < 0,4$ aceito como concordância fraca, $0,4 < \kappa < 0,7$ como boa e $\kappa > 0,7$ como ótima.

Resultados e Discussão

Após a realização dos exames para observação dos sinais clínicos, oito cães foram classificados como assintomáticos (23,5%), 14 oligossintomáticos (41,2%) e 12 polissintomáticos (35,3%). As principais alterações clínicas observadas nos cães oligossintomáticos foram lesões gerais de pele e mucosas pálidas. Já os cães polissintomáticos encontravam-se bastante comprometidos, pois além das alterações gerais de pele, os mesmos apresentavam esplenomegalia, fígado icterico, emagrecimento, linfonodos hipertróficos e onicogrifose. As alterações cutâneas mais observadas nesses cães foram as dermatites, caracterizadas por: hiperqueratose,

Tabela 1. Número (N) e porcentagens (%) de cães positivos para Leishmaniose Visceral pelos testes sorológicos (RIFI e ELISA), parasitológicos (HE e IMIQ) e molecular (PCR), em amostras de peles sadias e com lesão de cães naturalmente infectados e classificados em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P). Ilha Solteira, 2008.

Grupos (N)	Exames sorológicos e de pesquisa parasitária – N (%)					
	ELISA	RIFI	RIFI/ELISA	HE	IMIQ	PCR
A (8)	1 (12,5)	1 (12,5)	1 (12,5)	3 (37,5)	4 (50,0)	8 (100,0)
O (14)	11 (78,6)	8 (57,1)	12 (85,7)	3 (21,4)	4 (28,6)	14 (100,0)
P (12)	10 (83,3)	10 (83,3)	11 (91,7)	9 (75,0)	11 (91,7)	12 (100,0)
Total (34)	22 (64,7)	19 (55,9)	24 (70,6)	15 (44,1)	19 (55,9)	34 (100,0)

ELISA: ensaio imunoenzimático; RIFI: reação de imunofluorescência indireta; HE: técnica histoquímica de hematoxilina e eosina; IMIQ: técnica de imunohistoquímica; PCR: reação em cadeia da polimerase.

otas de *Leishmania* sp. pelos exames parasitológicos histoquímicos (HE), imunistoquímica (IMIQ) e DNA pela PCR em cães com Leishmaniose Visceral. Ilha Solteira, 2008.

Classificação das peles (N)	Exames parasitológicos e molecular – N (%)		
	HE	IMIQ	PCR
Sadia (22)	5 (22,7)	7 (31,8)	22 (100,0)
Lesão (23)	11 (47,8)	13 (56,5)	22 (95,6)
Total (45)	16 (35,6)	20 (44,4)	44 (97,8)

HE: técnica histoquímica de hematoxilina e eosina; IMIQ: técnica de imunistoquímica; PCR: reação em cadeia da polimerase.

et al., 2006), pois, segundo Ordeix et al. (2005), a técnica PCR é sensível o suficiente para detectar um número muito baixo de parasitas nas amostras de tecidos cutâneos. Em concordância, neste trabalho, a maior positividade foi obtida quando se utilizou a PCR, que foi de 100%, independentemente dos sinais clínicos, da sorologia e da presença de parasitas na pele (Tabela 1).

Para o diagnóstico da LVC, as técnicas sorológicas são consideradas rápidas e práticas, mas com sensibilidade variável e especificidade baixa (BADARÓ et al., 1983; INIESTA et al.,

Tabela 3. Análise comparativa do número (nc) e porcentagens (%) de concordância e índice Kappa (κ) entre as técnicas imunistoquímica (IMIQ) \times ELISA, IMIQ \times RIFI, ELISA \times RIFI, PCR \times IMIQ, PCR \times ELISA e PCR \times RIFI para diagnóstico de Leishmaniose Visceral em cães naturalmente infectados e classificados em assintomáticos (A), oligossintomáticos (O) e polissintomáticos (P).

Comparação entre os exames/nc (%)	Grupos			
	A (N = 8)	O (N = 14)	P (N = 12)	Total (N = 34)
IMIQ \times ELISA	5 (62,5) $\kappa = 0,25$	7 (50,0) $\kappa = 0,20$	11 (91,7) $\kappa = 0,62^*$	23 (67,6) $\kappa = 0,32$
IMIQ \times RIFI	5 (62,5) $\kappa = 0,25$	10 (71,4) $\kappa = 0,46^*$	11 (91,8) $\kappa = 0,62^*$	26 (76,5) $\kappa = 0,52^*$
ELISA \times RIFI	8 (100,0) $\kappa = 1,0$	9 (64,3) $\kappa = 0,22$	10 (83,3) $\kappa = 0,40$	27 (79,4) $\kappa = 0,57^*$
PCR \times IMIQ	4 (50,0) **	4 (28,6) **	11 (91,6) **	19 (55,9) **
PCR \times ELISA	1 (12,5) **	11 (78,6) **	10 (83,3) **	22 (64,7) **
PCR \times RIFI	1 (12,5) **	8 (57,1) **	10 (83,3) **	19 (55,8) **

*Estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$). Intervalo de confiança = 95%.

**Não foi possível fazer o teste para índice Kappa devido à positividade total da PCR.

ELISA: ensaio imunoenzimático; RIFI: reação de imunofluorescência indireta; HE: técnica histoquímica de hematoxilina e eosina; IMIQ: técnica de imunistoquímica; PCR: reação em cadeia da polimerase; N: número de animais por grupo.

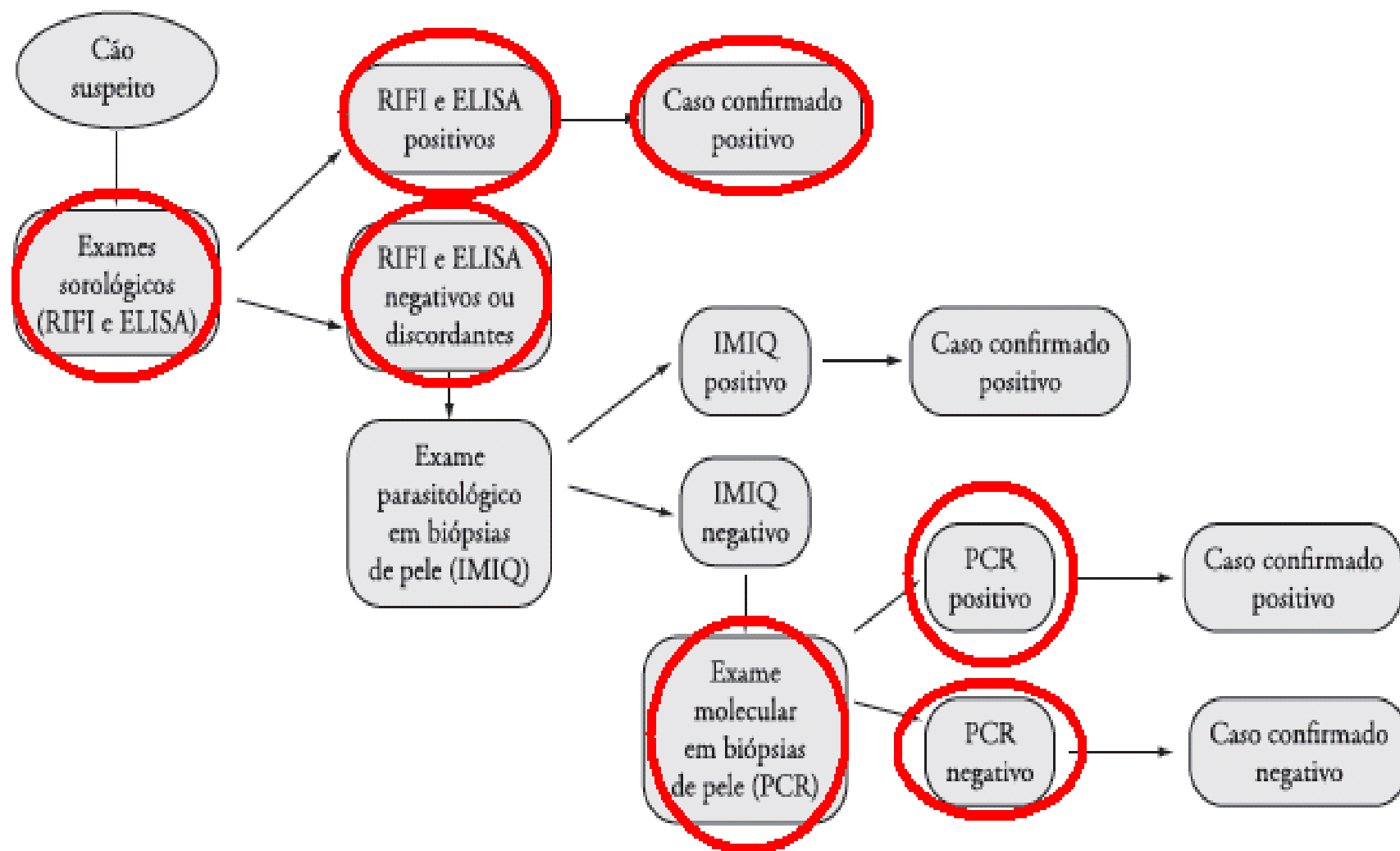


Figura 1. Diagrama para orientação do diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina.

PCR-ELISA detection of *Escherichia coli* in milk

P. Daly, T. Collier and S. Doyle

Department of Biology, National University of Ireland, Maynooth, Ireland

2001/232: received 6 August 2001 and accepted 19 December 2001

P. DALY, T. COLLIER AND S. DOYLE. 2002.

Aims: The purpose of this study was to develop a reliable molecular procedure for the detection of *Escherichia coli* in milk.

Methods and Results: Robust and expeditious DNA extraction and PCR techniques were evaluated using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) detection of biotin-labelled amplicons to facilitate optimal detection of *E. coli* DNA.

Conclusions: It was found that 5 *E. coli* colony-forming units (cfu) could be detected per PCR reaction using the PCR-ELISA system, equating to a sensitivity of detection of 100 *E. coli* cfu ml⁻¹ pasteurized milk.

Significance and Impact of the Study: This approach should facilitate evaluation of milk contamination and enable rapid detection of *E. coli* mastitis, leading to correct deployment of relevant antibiotic therapy and improved animal welfare.

INTRODUCTION

In recent years *Escherichia coli* has become recognized as a serious food-borne pathogen and has been associated with numerous outbreaks of disease in the UK, Japan and USA (Uyttendaele *et al.* 1999; Scotter *et al.* 2000). Raw milk and dairy products, such as pasteurized milk and yoghurt contaminated with *E. coli*, have been the main cause of

strains of *E. coli*, such as O157, fail to produce this enzyme (Yokoigawa *et al.* 1999). In addition, β -D-glucuronidase is also produced by members of the *Salmonella*, *Shigella* and some *Yersinia* spp., while *Staphylococcus* spp. can also hydrolyse MUG. Thus, more accurate methods for detecting *E. coli* are necessary (de Boer 1998).

Polymerase chain reaction (PCR) has led to rapid and sensitive detection of *E. coli* from clinical samples

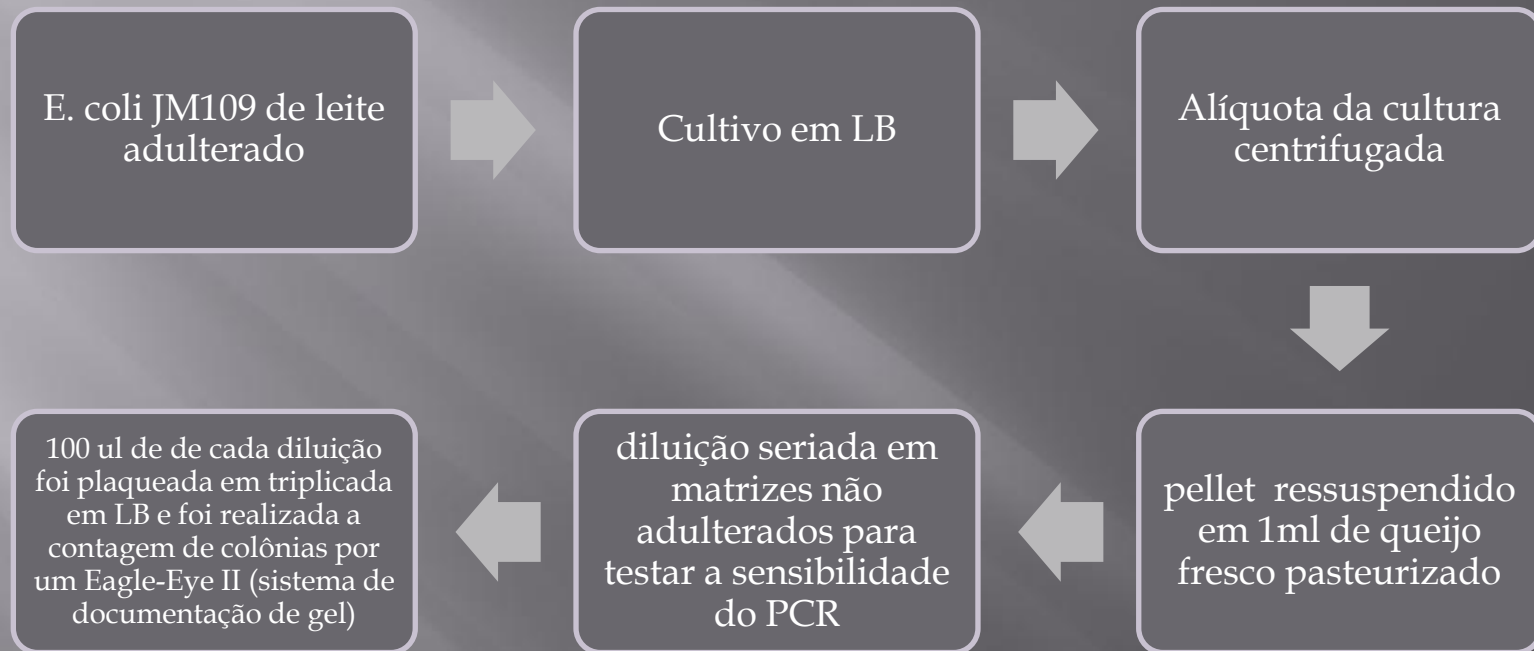
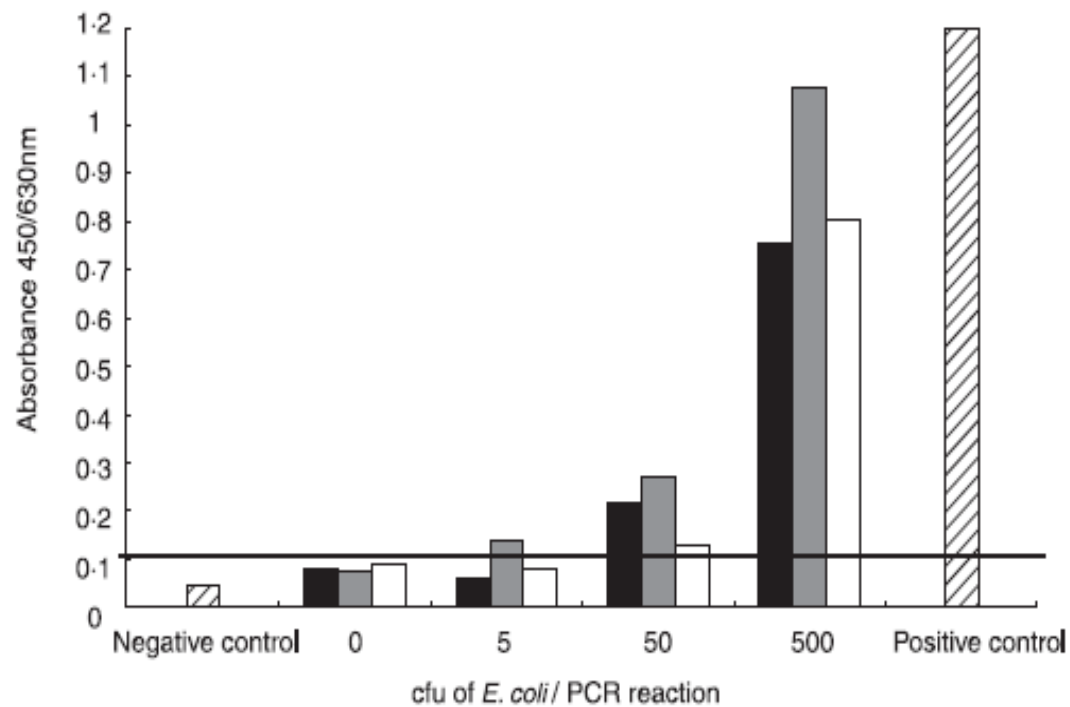


Fig. 2 PCR-ELISA analysis of raw milk (■), pasteurized milk (▨) and PBST (□) containing 0–500 cfu *Escherichia coli* obtained following alkaline extraction procedure. Negative and positive controls are also indicated. Assay cut-off (horizontal line) was calculated by replicate analysis of eight negative specimens and was determined to be 0.105 O.D. units ($\text{mean}_{\text{negatives}} + 2 \text{ standard deviations}$, i.e. $0.065 + 2 (0.02)$)



Referências

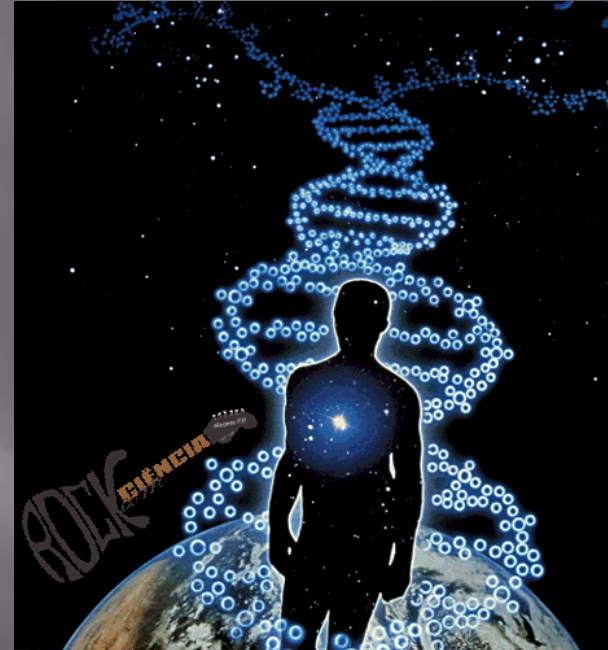
- ▣ Zaha, A. Ferreira, H. Passaglia, L. **Biologia molecular básica** – 4^a edição. Porto Alegre, 2012.
- ▣ <http://www.info.sciverse.com/sciencedirect>
- ▣ <http://www.cpqrr.fiocruz.br/posgraduacao/cienciasdasaude/apoio/BiologiaMolecular/aula3%20OutrasTecnicasPCR-2007.pdf>
- ▣ <http://www.fisiologia.kit.net/biomol/4.htm>

Referências

- ▣ <http://www.pcrstation.com/nested-pcr/nested-pcr-protocol/>
- ▣ http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Prof%C2%AA%20Cristina%20-%20Biologia%20Celular/Principios_da_PCR.pdf
- ▣ <http://technologyinscience.blogspot.com.br/2011/12/elisa-protocol-types-of-elisa.html>
- ▣ <http://www.ufrgs.br/labvir/material/aulap10.pdf>

- ▣ https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cach e:t_DI5XjABMIJ:www.icb.ufmg.br/mor/pad-morf/ELISA.doc+&hl=pt-BR&gl=br&pid=bl&srcid=ADGEEESgxySqze5N QiVIp0i1wLgimZe9ejF4SLgZ5tQszc_KgBGqvP AgYdB7cWbB2rW9gerKfn3dS3lQ2leFKQM509 U5ZlT5EkzyTyWVPFynSWQovCsHlwlmjGHY UCYlBWYfLr4rYpgN5&sig=AHIEtbQs_m-EOK_BUpyUGZPJliAXql3Kgw

Conclusão



Muito Obrigado pela Atenção!

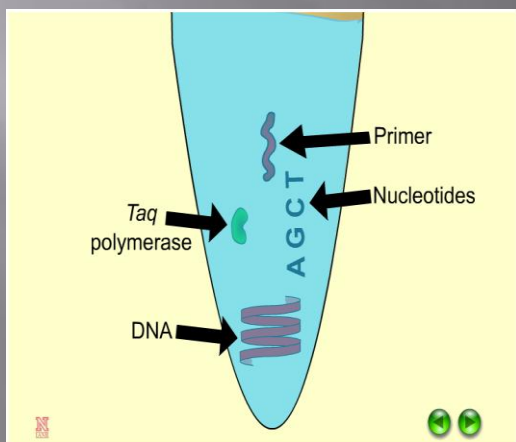


UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
BIOLOGIA MOLECULAR



PCR

Nested e Elisa



Nathaniele Nebel Barther
Samantha Perleberg Vargas

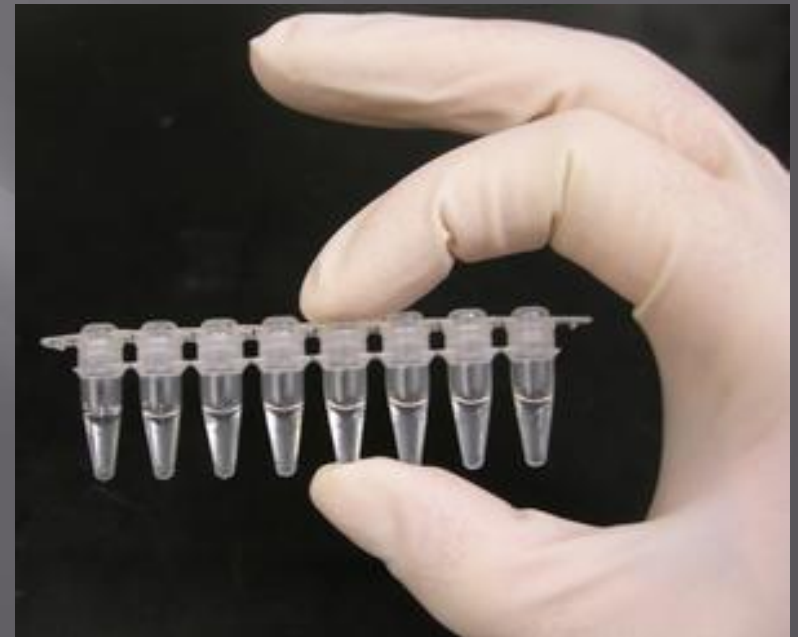
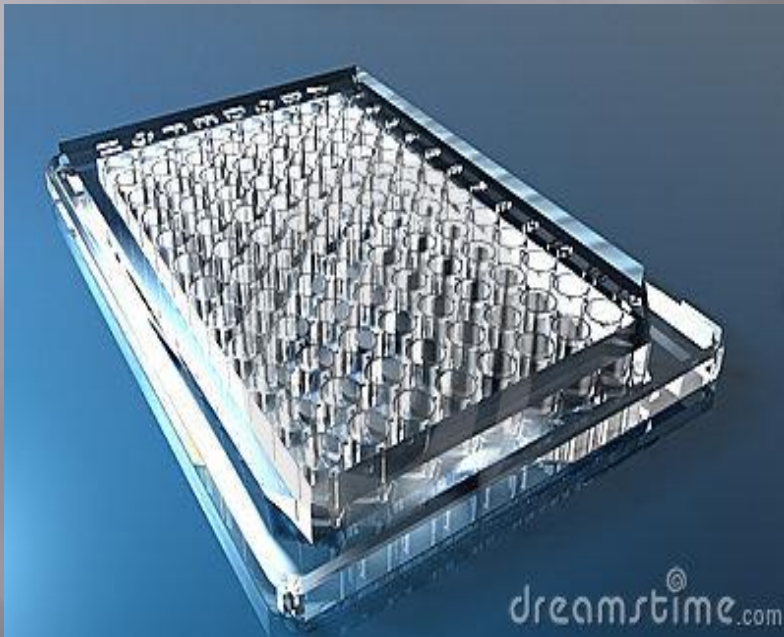
O que é PCR?

- ▣ A PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) é uma técnica que se baseia na amplificação exponencial seletiva de uma quantidade de DNA *in vitro*.
- ▣ Pode ser usada no diagnóstico médico, mapeamento genético, detecção de doenças hereditárias, clonagem de genes, testes de paternidade e entre outros.

Apresentados pelo grupo:

PCR – Elisa

PCR- Nested



PCR- Elisa

- ▣ É a união do PCR, que é um método molecular, com o teste Elisa, que é um teste imunológico.
- ▣ O teste Elisa é um método de ensaio imunoenzimático utilizado para detectar o antígeno ou anticorpo em uma amostra.
- ▣ Tem sido utilizada desde o final de 1980.

Vantagens

- ◉ Apresenta alta sensibilidade- a quantificação pela placa de Elisa é de aprox. 100 vezes mais sensível do que a coloração convencional com brometo de etídio dos produtos em gel de agarose.
- ◉ Altamente específico
- ◉ Resultados mais rápidos
- ◉ É muito flexível
- ◉ Baixo custo
- ◉ Amplificação rápida
- ◉ Técnica prática e simples
- ◉ Quantitativo
- ◉ Rotina de larga-escala

Aplicações

- ▣ Tem sido principalmente utilizado para a detecção de agentes infecciosos, incluindo vírus, bactérias, protozoários e fungos.
- ▣ Um exemplo é o uso do PCR-Elisa para a identificação do vírus HIV, que é confirmada com o teste WESTERN BLOT.
- ▣ É útil para o rastreio de amostras múltiplas.

- ▣ Permite a realização da quantificação dos produtos.
- ▣ É útil para diferenciar os produtos gerados pelo PCR com variações na sequência entre os primers.
- ▣ Serve para detectar e diferenciar entre alvos múltiplos- seleção de várias amostras.

Tipos de PCR-Elisa

- ▣ Indireto: é usado para a detecção de anticorpos.
- ▣ Sanduíche ou Direto: utilizado para a identificação de antígenos.
- ▣ Competitivo: é mais usado para identificação de antígenos, mas pode também ser empregado para a detecção de anticorpos.

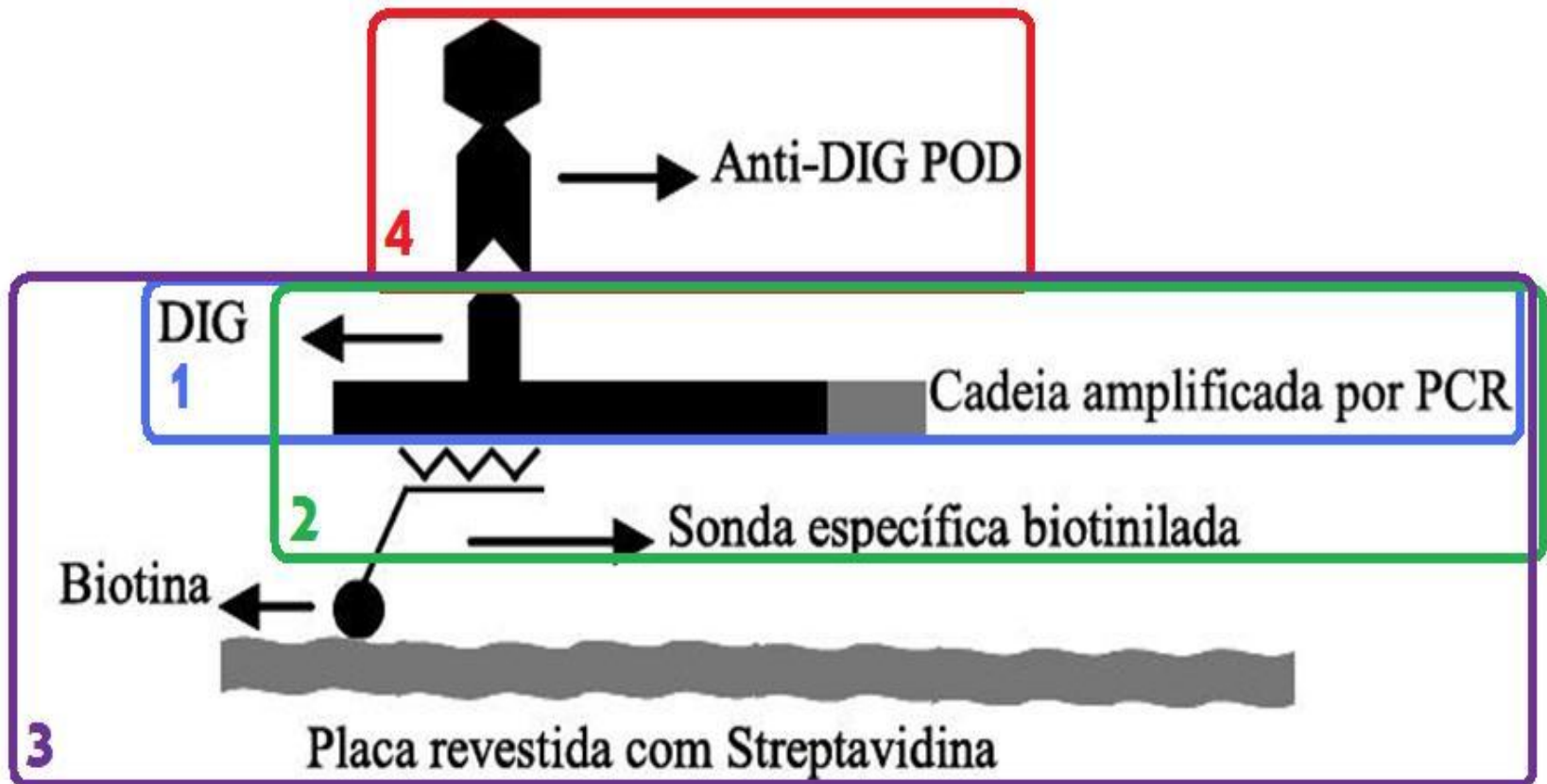
Protocolo

- Tampão 10x
- dNTP's
- Um par de primers
- Água
- MgCl₂
- Taq- polimerase
- DNA – amostra
- DIG- digoxina ou anti-DIG
- Sensibilizar a placa com antígeno ou anticorpo.
- Colocar nos poços e deixar “overnight” a 4°C.
- Lavar com PBS-Tween 0,02 % (2x).
- - Bloquear a placa com uma solução PBSTL e agitar.
- - Levar a estufa 37oC por 1 hora
- - Lavar novamente com PBSTL (2 x)
- - Diluir os soros em PBSTL e aplicar por poço e agitar
- - Levar por mais 1 hora na estufa 37oC
- - Lavar com PBSTL (3 vezes)
- - Preparar uma solução de Uréia 6M e aplicar nos poços
- - Aplicar o Conjugado em PBSTL e agitar
- - Levar a estufa de CO₂ 37oC por 1 hora
- - Lavar com PBS-Tween 0,02% (3 vezes)
- - Aplicar o OPD por 30 minutos em câmara escura
- - Adicionar HCl a fim de parar a reação e em seguida proceder a leitura no leitor de microplacas.

Como funciona a técnica:

- Adição do híbrido a uma placa previamente revestida com Estreptavidina – ligação da Biotina (sonda) com a Estreptavidina (placa) - placa marcada com peroxidase.
- Adição de um conjugado contendo:
 - um anticorpo (Anti-DIG) que irá se ligar ao DIG na sequência; um substrato (POD) revelador e específico para a peroxidase – revelação da cor pela degradação enzimática do substrato.
 - Após deixar em repouso para que a amostra sofra coloração e assim é feita a leitura.
 - A coloração é dependente da quantidade de híbridos.

Como é realizado:



Artigos



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Microbiological Methods 65 (2006) 247–257

Journal
of Microbiological
Methods

www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Evaluation of MAT, IgM ELISA and PCR methods for the diagnosis of human leptospirosis

Márcia Costa Ooteman^a, Annamaria Ravara Vago^b, Matilde Cota Koury^{a,*}

^a*Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, CP 486, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

^b*Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil*

Received 29 April 2005; received in revised form 11 July 2005; accepted 27 July 2005

Available online 25 October 2005

Abstract

Serum samples from 125 patients with clinical suspicion of leptospirosis were tested by the microscopic agglutination test (MAT), IgM ELISA and PCR for the diagnosis of the disease.

Most patients were adult males and 74.1% ($p < 0.001$) of the patients exposed to water and 77.6% ($p < 0.001$) of those exposed to animals, were respectively considered confirmed or probable cases by MAT. The clinical symptoms mainly observed among the patients considered confirmed or probable cases were fever (95.6%), jaundice and headache (79.4%), myalgia (77.9%), nausea and vomiting (64.7%). About 63% of the confirmed or probable cases were patients that lived in Belo Horizonte, a big city of the Minas Gerais state, Brazil, showing the occurrence of urban leptospirosis.

Among the 47 confirmed cases of leptospirosis diagnosed by MAT, 44 (94%) serum samples were positive by IgM ELISA and 17 (36%) were PCR positive. Among the 33 probable cases, 10 (30%) samples showed positive amplification by PCR. By considering MAT as the standard test, the sensitivity and specificity of IgM ELISA was 96.6% and 93.3%, respectively. A relevant finding in our study was the number of positive cases verified by PCR (13–29%) and IgM ELISA (3–7%) among the 45 unconfirmed cases by MAT, demonstrating the value of PCR in the early diagnosis of human leptospirosis.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: IgM ELISA; Microscopic agglutination test-MAT; PCR

A Sensitive and Specific IgM-ELISA for the Serological Diagnosis of Human Leptospirosis Using a rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 Fusion Protein*

SUN AiHua^{1,2}, WANG Yuan³, DU Peng¹, WU ShengLing¹, and YAN Jie^{2,#}

1.Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, Zhejiang, China; 2.Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 3.The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

Abstract

Objective To construct a *lipL32/1-lipL21-OmpL1/2* fusion gene and its prokaryotic expression system, and to establish an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 fusion antigen of *Leptospira interrogans* for sensitive and specific detection of IgM in the serum of patients with leptospirosis.

Methods *lipL32/1-lipL21-OmpL1/2* fusion genes were constructed using a primer-linking PCR. The target recombinant protein antigens, rLipL32/1, rLipL21, rOmpL1/2 and rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2, were expressed and the purified antigens were then immobilized to the surface of microplate wells for ELISA-based detection of IgM in the sera of leptospirosis patients.

Results Of 493 acute leptospirosis patients, 95.7% and 97.8% were positive by rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2-IgM-ELISA using different serum dilutions, which was higher than the rLipL32/1-IgM-ELISA (93.1% and 90.3%), rLipL21-IgM-ELISA (90.3% and 87.0%), and rOmpL1-IgM-ELISA (85.6% and 81.1%) ($P < 0.01$). All IgM-ELISAs tested negative against 56 non-leptospirosis patients with typhoid fever, hemorrhagic fever or dengue fever.

Conclusion Trigeminal fusion antigen increases ELISA sensitivity and the rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2-IgM-ELISA is a sensitive and specific serological diagnostic method for clinical leptospirosis.

Key words: *Leptospira*; Outer membrane protein; Fusion antigen; Recombinant expression; IgM-ELISA

Table 3. Primer Sequences and Product Sizes

Genes	Primer Sequences (5' to 3')
<i>lipL32/1</i>	F: ccg cat atg (Nde I) tgt ggt gct ttc ggt ggt ctg R: GCT GCC ACC GCC GCC GCT GCC ACC GCC GCC GCT GCC ACC GCC GCC ctt agt cgc gtc aga agc agc
<i>lipL21</i>	F: GGC GGC GGT GGC AGC GGC GGC GGT GGC AGC GGC GGC GGT GGC AGC tgt tcc agt act gac aca gga R: GCT GCC ACC GCC GCC GCT GCC ACC GCC GCC GCT GCC ACC GCC GCC ctg ttt gct cac ttc ctg cgc
<i>lipL32/1-lipL21</i>	F: ccg cat atg (Nde I) tgt ggt gct ttc ggt ggt ctg R: GCT GCC ACC GCC GCC GCT GCC ACC GCC GCC GCT GCC ACC GCC GCC ctg ttt gct cac ttc ctg cgc
<i>ompL1/2</i>	F: GGC GGC GGT GGC AGC GGC GGC GGT GGC AGC GGC GGC GGT GGC AGC aaa aca tat gca att gta gga R: gca ctc gag (Xho I) ttc gtg ttt ata acc gaa
<i>lipL32/1-lipL21-ompL1/2</i>	F: ccg cat atg (Nde I) tgt ggt gct ttc ggt ggt ctg R: gca ctc gag (Xho I) ttc gtg ttt ata acc gaa

Note: F: forward primers; R: reverse primers. The sequences in capital indicate the flexible peptide linker GGGSGGGGSGGGGS.

IgM-ELISAs

Protein samples (rLipL32/1, rLipL21, rOmpL1/2, or rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2) were diluted to 50 µg/mL using 0.01 mol/L carbonate sodium buffer (pH9.6) before 100 µL was loaded into each well of a 96-well polystyrene microplate and incubated at 4 °C overnight. The next day, the microplate was washed three times with 0.05% Tween 20/0.01 mol/L phosphate buffered saline (PBS) (pH7.4), and then blocked using 10% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA) solution. A 1:50 or 1:100 dilution of serum samples were used as the primary antibody and 1:3 000 diluted goat anti-human HRP-labeling IgM (Jackson ImmunoResearch) as the second antibody to detect infection within the 493 sera from leptospirosis patients using the rLipL32/1-IgM-ELISA, rLipL21-IgM-ELISA, rOmpL1/2-IgM-ELISA, and rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2-IgM-ELISA. For all ELISAs, sera from 32 typhoid fever, 18 hemorrhagic fever and 6 dengue fever patients were diluted as described above and used as controls. Patient's serum was regarded as positive if its OD₄₉₀ value was \geq to the mean plus three standard deviations (SD) of the control samples^[34].

RESULTS

PCR and Sequencing Results

The *lipL32/1-lipL21-ompL1/2* fusion gene fragment was successfully obtained by overlap extension PCR.

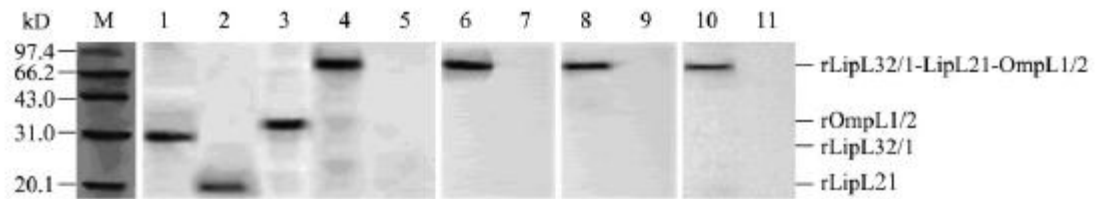


Figure 1. Immunoreactivity of rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 and its antiserum using western blot assay. M: protein maker (BioColor); 1 to 4: western hybridization bands of rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 antiserum with rLipL32/1, rLipL21, rOmpL1/2, and rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 proteins, respectively; 6, 8, and 10: western hybridization bands of rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 with rLipL32/1, rLipL21, or rOmpL1/2 antiserum, respectively; 5, 7, 9, and 11: protein-free blank controls.

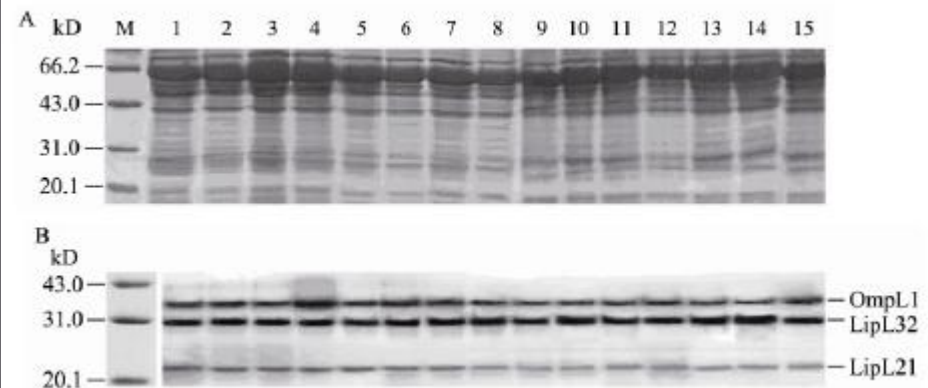


Figure 2. Western blot results using rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 antiserum with leptospiral OMP target protein antigens. M: protein maker (BioColor); A1 to A15: SDS-PAGE map of the OMP extracts from fifteen standard leptospiral strains Lai, Lin, 65-9, Luo, P7, L37, Lin6, L183, Lin4, Tian, Nan10, M10, Pishu, 55-52, and L105, respectively; B1 to B15: western hybridization bands of rLipL32/1-LipL21-OmpL1/2 antiserum with LipL21s (about 21 kDa), LipL32s (about 32 kDa), and OmpL1s (about 35 kDa) in the OMP extracts, respectively.

PCR-Nested

- ▣ O que é? Consiste na realização de dois PCR sucessivos utilizando um jogo diferente de iniciadores específicos em cada uma das reações. Isto permite aumentar nível de sensibilidade do método de diagnóstico e aumentar a especificidade da detecção.

Vantagens

- ▣ Altamente específico
- ▣ Duas PCR'S
- ▣ É a de maior sensibilidade
- ▣ Detecção de amostras múltiplas simultâneas

Desvantagens

- ▣ Maior tempo de execução
- ▣ Custo elevado
- ▣ Maior risco de contaminação

Protocolo

▣ 1° PCR:

External Round of PCR

Master Mix

dNTP mix (2mM each dNTP)	5 μ l
10x PCR buffer (15mM MgCl ₂)	5 μ l
Taq polymerase (0.2U)	0.2 μ l
dH ₂ O	25.8 μ l
Primer mix. Forward and Reverse primers. (5 pmoles/ μ l each)	4 μ l
Total Masternix Volume:	40 μl

DNA Template	10 μ l
--------------	------------

▣ 2° PCR:

Internal Round of PCR

Nested PCR Master Mix

dNTP mix (2mM each dNTP)	5 μ l
10x PCR buffer (15mM MgCl ₂)	5 μ l
Taq polymerase (0.2U)	0.2 μ l
dH ₂ O	35.8 μ l
Primer mix. Forward and Reverse primers. (5 pmoles/ μ l each)	4 μ l
Total Mastermix Volume:	49 μl

DNA Template (Sample from external round PCR product)	1 μ l
---	-----------

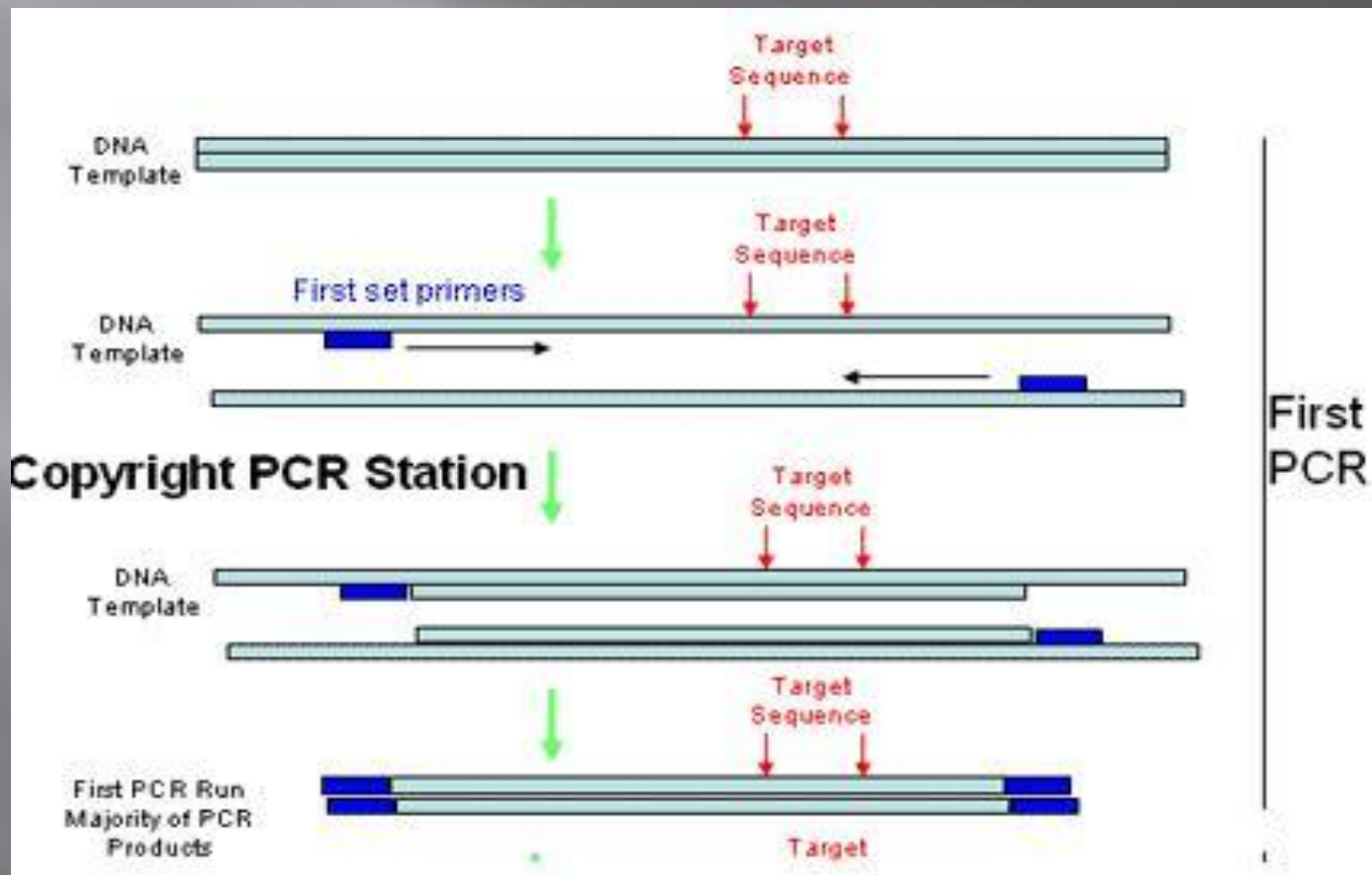
PCR- termociclador

- ▣ 1 ciclo: 94°C por 30 segundos
- ▣ 35 ciclos: 94°C por 30 segundos
55°C por 30 segundos
72°C de 30 até 120 segundos
- ▣ Manter a 4°C

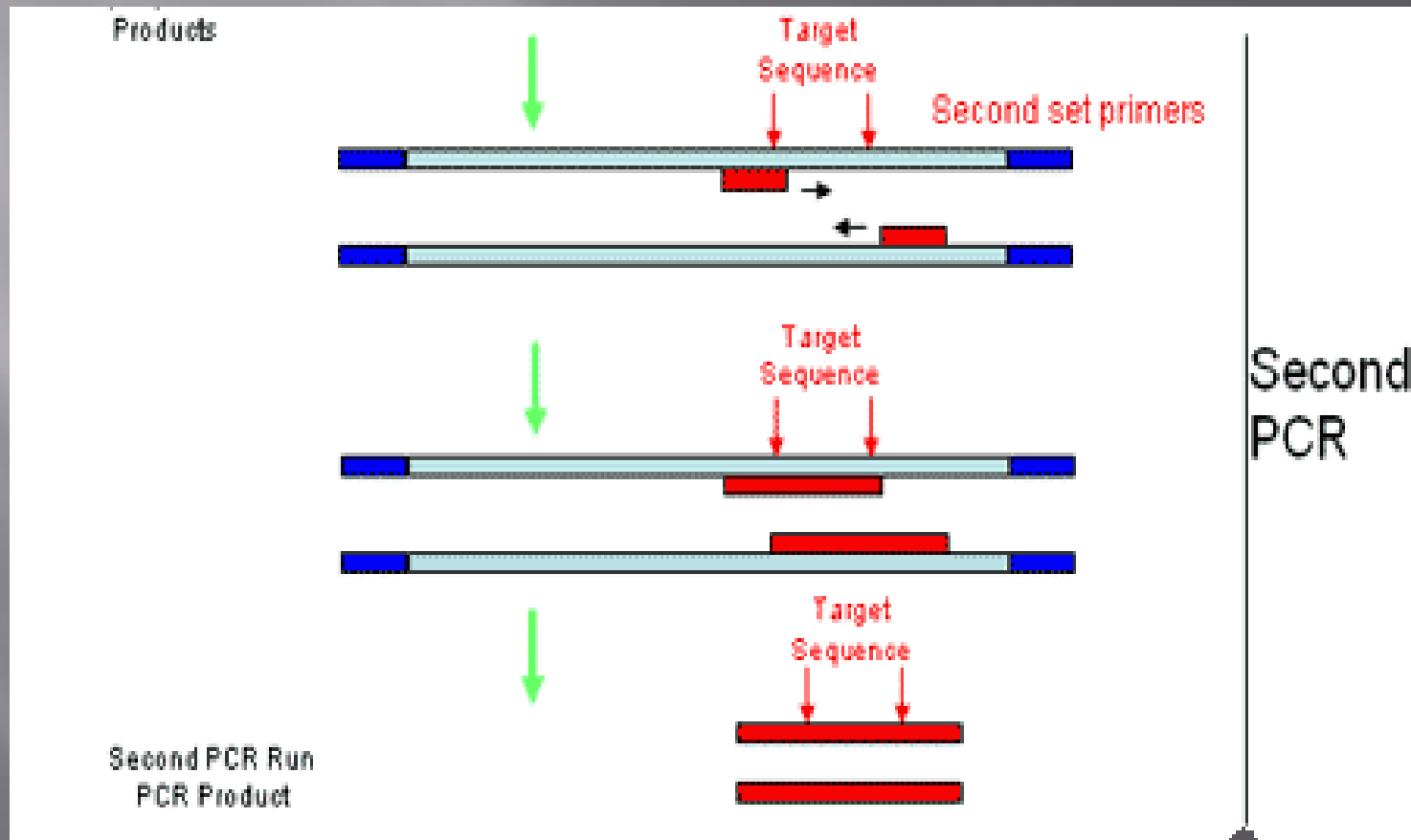
Como funciona a técnica:

- ▣ O primeiro par de iniciadores de PCR amplifica um fragmento similar para começar o PCR . No entanto, um segundo par de primers chamado de nested primers, ligam-se no interior do primeiro fragmento do produto de PCR ,permitindo a amplificação de um segundo produto de PCR, que é mais curto e específico que o primeiro.
- ▣ O segundo par de primers tem a função de amplificar pedaços menores e específicos de DNA localizados no produto do primeiro PCR.

- 1ª parte: PCR e primeiro conjunto de primers



- 2ª parte: Segundo PCR e segundo conjunto de primers (Nested)

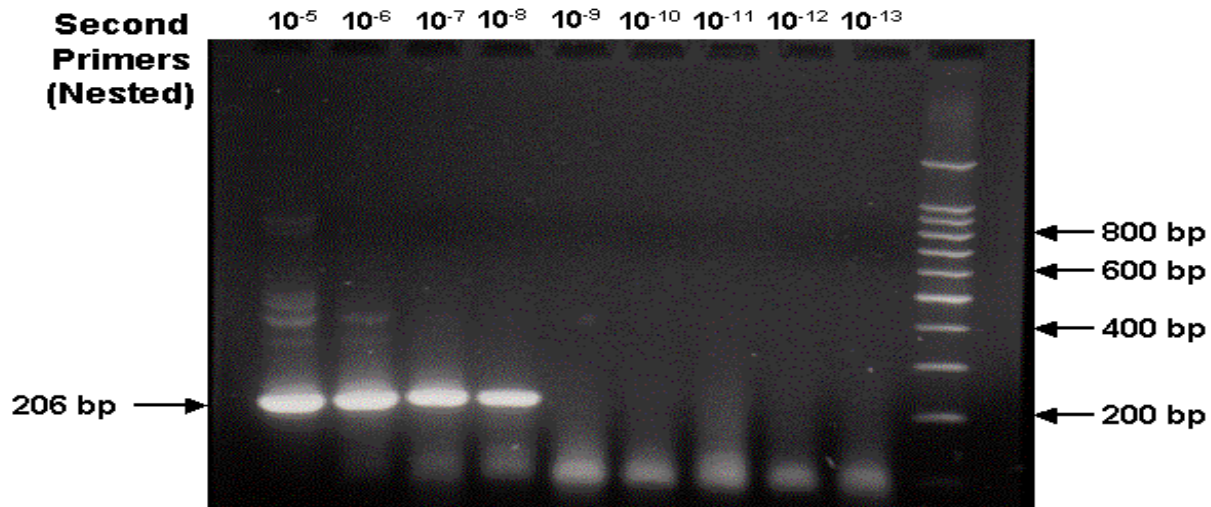
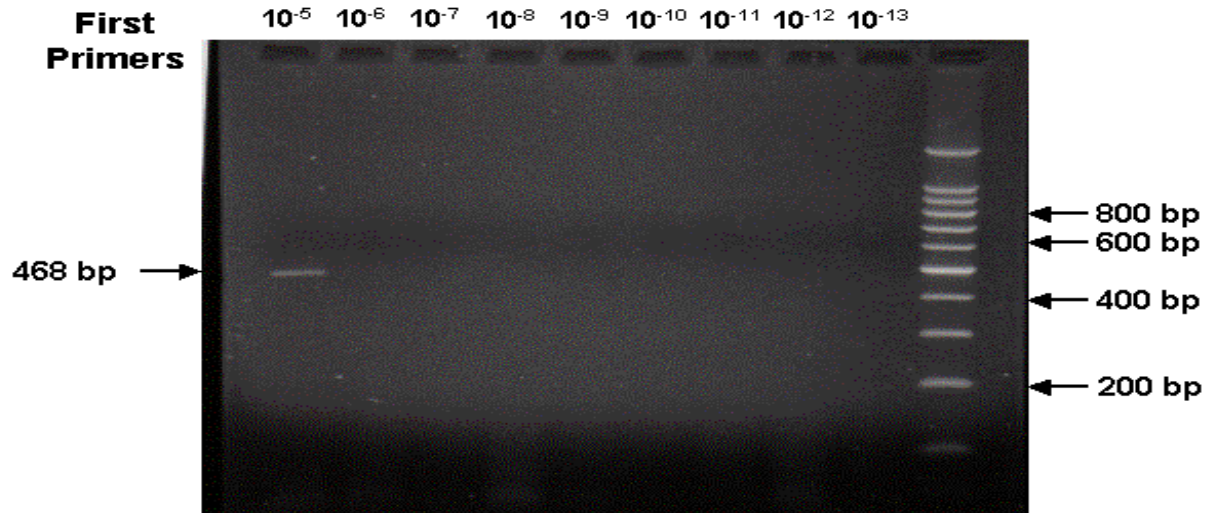


Aplicações

- ▣ Aplicações forenses
- ▣ Casos genéticos
- ▣ Análise de patógenos como HPV

IVP gag HTLV-2 PCR System Titration

Dilution of Positive HTLV-2 DNA Control



Artigos

DETERMINAÇÃO DO LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA DE PCR "NESTED" PARA O VÍRUS DA HEPATITE B (HBV)*EVALUATION OF MINIMUM DETECTION LIMIT TO HEPATITIS B VIRUS (HBV) PCR "NESTED"*

Tiago Bottin Coser^{1,2}, Marisa Chesky¹, Fernanda de-Paris¹, Afonso Luis Barth¹, Virginia Minghelli Schmitt²,
Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado¹

RESUMO

Mundialmente, a hepatite pelo vírus B (HBV) é considerada um dos maiores problemas de saúde pública, apesar da vacinação. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 2 bilhões de pessoas estejam infectadas pelo HBV. O Brasil é classificado como área de incidência intermediária pela OMS. No entanto, estudos de prevalência detectaram diferenças de índices de infecção nas regiões geográficas: 8% na região Amazônica, 2,5% nas regiões Centro-Oeste e Nordeste, 2% na Sudeste e 1% na região Sul. Um diagnóstico sensível e específico é de fundamental importância para os pacientes portadores do HBV. O objetivo deste estudo foi determinar o limite mínimo de detecção da técnica de PCR "nested" "in house" para o HBV. Diluições seriadas de uma amostra quantificada de HBV (1000 cópias/mL; 750 cópias/mL; 500 cópias/mL; 250 cópias/mL) foram submetidas à técnica de PCR "nested". O alvo da amplificação por PCR foi a região do core e pré-core do vírus. Para extração dos ácidos nucleicos da amostra foi empregado o kit comercial QIAmp. O limite mínimo de detecção encontrado foi de 500 cópias/mL ou 10 cópias por reação de PCR.

Unitermos: HBV, PCR, limite mínimo de detecção.

ABSTRACT

All over the world, the hepatitis B virus (HBV) is considered one of the major problems of public health, despite vaccination. World Health Organization (WHO) estimates that more than 2 billions of persons are infected by HBV. Brazil is classified as an area of intermediary incidence by WHO. However, prevalence studies have detected differences of infection indexes in geographic regions: 8% in the Amazonian region, 2,5% in middle-west and Northeast, 2% in Southeast and 1% in South. A sensitive and specific diagnosis is very important to the HBV carrier patients. The aim of this study was to determine the minimum limit of detection of the nested PCR in house technique for HBV. Serial dilutions of one quantified sample of HBV (1000 copies/mL; 750 copies/mL; 500 copies/mL; 250 copies/mL) were submitted to a nested PCR. The target of PCR was viral core and pre-core region. Commercial kit, QIAmp, was employed to purify nucleic acids from the sample. The minimum detection limit found was 500 copies/mL or 10 copies per PCR reaction.

Keywords: HBV, PCR, minimum detection limit.

RESULTADOS

Limite mínimo de detecção

O limite mínimo de detecção da reação de PCR "nested" para o vírus da hepatite B foi de 500 cópias/mL com 100% de positividade (Tabela 1). Utilizando 10 μ L de DNA extraído das diluições de soro testadas na reação de PCR e corrigindo a concentração da amostra, o limite mínimo de detecção por reação foi de 10 cópias virais.

Tabela 1 - Porcentagem de positividade do limite mínimo de detecção.

Diluições	Amostras positivas (n=9 repetições)
250 cópias/mL	1 (11,1%)
500 cópias/mL	9 (100%)
750 cópias/mL	9 (100%)
1000 cópias/mL	9 (100%)

A presença de fragmentos específicos de 377 pb de HBV foram comparados com um controle positivo para o HBV e com um marcador de peso molecular de 100 pb (figura 1).

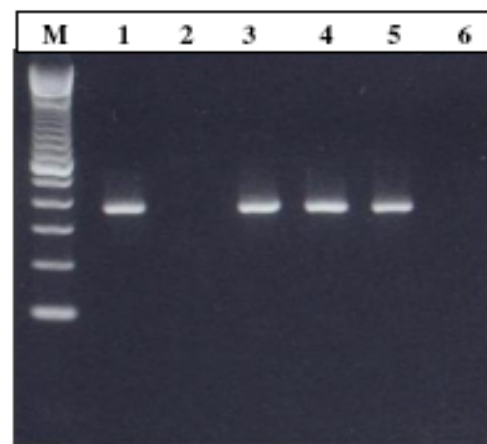


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 2 % mostrando os fragmentos da amplificação das diluições pesquisadas. 1- Controle positivo (377 pb) 2- Controle negativo 3- Diluição 1000 Cópias/mL (377 pb) 4- Diluição 750 Cópias/mL (377 pb) 5- Diluição 500 Cópias/mL (377 pb) 6- Diluição 250 Cópias/mL e M marcador peso molecular (100 pb).

METODOLOGIA

Foram realizadas 4 diluições (1000 cópias/mL; 750 cópias/mL; 500 cópias/mL; 250 cópias/mL) de uma amostra de soro de concentração conhecida (de 2000 cópias/mL) de DNA do HBV, determinada pelo método de PCR usando o kit Amplicor Roche[®] de quantificação de HBV-DNA. A amostra foi gentilmente cedida pelo Laboratório Amplicon e armazenada durante o período de 2 meses em freezer a -20°C.

AS AMOSTRAS DE DNA foram submetidas a técnica de PCR "nested", que utiliza duas reações de amplificação com dois pares de "primers" diferentes. Na primeira reação, os "primers" externos MDD2 (5' GCG AAG CTT GAG GAA TAA AGC CCC GTA AA 3') e HDM3 (5' GCG CTG CAG GAG TTG GGG AGG AGA TTA 3') produzem um amplicon viral de 771 pb (pares de base). Na segunda reação, os "primers" internos MDN5 (5' GCG CTG CAG GAG GCT GTA GGC ATA AAT 3') e HDB2 (5' GCG AAG CTT AGA TCT CTG GAT GCT GGA 3'), originam um fragmento de 377 pb, utilizando como DNA molde o amplicon da primeira reação (8).

Cada reação de PCR na primeira etapa continha 16mM (NH₄)₂SO₄, 67mM Tris-HCl (pH 8,8 à 25°C), 1,5mM MgCl₂, 0,01% (w/v) de Tween-20 (tampão de PCR, Southern Cross Biotechnology Ltd., Cape Town, South Africa), 200nM dNTP mix (ABgene[®], Epsom, UK), 200nmol de "primers" externos (Invitrogen[®], Carlsbad, USA), 1,25 U de enzima Super-Therm DNA polimerase (Southern Cross Biotechnology Ltd., Cape Town, South Africa) e 10 μ L de cada diluição viral extraída. O volume final da reação foi de 50 μ L e a amplificação foi executada em termociclador PTC-100 (MJ Research[™], Waltham, USA), utilizando-se um período de desnaturação inicial de 94°C por 1 minuto e 40 segundos, seguido de 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 50°C e 30 segundos de polimerização a 72°C.

Na segunda reação de amplificação empregou-se o par de "primers" internos. Esta reação utilizou uma mistura idêntica a anterior excetuando-se que o volume total foi de 24 μ L e que foram utilizados 2 μ L do amplicon obtido na primeira reação de PCR como DNA alvo. O programa de amplificação consistiu de um período de desnaturação de 45 segundos a 94°C, seguido de 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 50°C e 30 segundos de polimerização a 72°C.

DISCUSSÃO

O desenvolvimento e aprimoramento dos métodos moleculares têm facilitado o diagnóstico das doenças infecciosas através da detecção do DNA do agente etiológico. Um diagnóstico sensível, específico e reprodutível é de importância fundamental para pacientes portadores da hepatite B. A técnica de PCR, como método de detecção do DNA do HBV é um indicador precoce da infectividade e da replicação viral, auxiliando no diagnóstico da infecção crônica, no monitoramento terapêutico e na terapia antiviral (17).

O presente estudo determinou o limite mínimo de detecção e obteve 500 cópias/mL para o vírus da hepatite B (HBV).

A sensibilidade da PCR "nested" "in house" apresentada neste estudo, foi de 500 cópias/mL ficando dentro dos valores encontrados na literatura e mostrou-se bastante reprodutível, pois apresentou o mesmo limite de detecção em 88,9% dos testes. Nos demais 11,1% o limite de detecção foi de 250 cópias/mL.

- ◉ Os procedimentos de preparação dos reagentes, processamento da amostra, amplificação, transferência do produto da primeira para a segunda etapa de PCR e detecção do produto amplificado, foram realizados em quatro ambientes distintos para eliminar a possibilidade de contaminação. Além disso, foram utilizados ponteiros com filtros de barreira e controles negativos em cada reação.

Infecções e reinfecções por *Rotavirus A*: genotipagem e implicações vacinais

Rotavirus A infections and reinfections: genotyping and vaccine implications

Paulo S. S. Costa¹, Divina D. P. Cardoso², Sandra J. F. E. Grisi³, Paula A. Silva⁴,
Fabiola Fiaccadori⁴, Menira B. L. D. Souza⁴, Rodrigo A. T. Santos⁴

Resumo

Objetivos: Identificar *Rotavirus A* em crianças com diarreia aguda, determinando os genótipos G e P prevalentes e avaliar a ocorrência de infecções e reinfecções por rotavírus do grupo A em crianças.

Métodos: Foram estudadas, prospectivamente, crianças com doença diarreica aguda e identificação de *Rotavirus A* em Goiânia (GO), durante o período de julho de 2000 a outubro de 2002. Igual número de crianças, pareadas por idade e sexo, que não apresentavam diarreia aguda e sem identificação de rotavírus nas amostras fecais à admissão ao estudo, representou o grupo controle. Foram analisadas a ocorrência de infecções ou reinfecções sintomáticas ou assintomáticas por rotavírus durante o período de estudo, durante um ano de seguimento em ambos os grupos. Todas as amostras positivas foram submetidas a genotipagem G e P através das reações de RT-PCR e Nested PCR.

Resultados: A infecção por rotavírus ocorreu em 37,2% (77 de 207 amostras fecais) das crianças com diarreia aguda durante o período do estudo. Os genótipos G e P identificados foram, simultaneamente: G1 (62,3%), G9 (34,4%) e G4 (3,3%) e P[8] (59%), P[6] (7,7%), P[6]+P[8] (23,1%), P[4]+P[8] (7,7%) e P[4]+P[6] (2,6%). As associações de genótipos G e P identificados durante o estudo foram: G1P[8] (77,8%), G9P[8] (11,1%), G4P[8] (5,6%) e G1P[6] (5,6%). Não houve reinfecção por rotavírus nos pacientes do grupo *Rotavirus A* (+) durante o período de seguimento, enquanto duas crianças do grupo controle apresentaram infecções sintomáticas por rotavírus durante o mesmo período.

Conclusões: Os genótipos G e P predominantes correspondem aos das candidatas atuais à vacina contra rotavírus. Não houve reinfecção por rotavírus pelo período de um ano em relação a todos os genótipos identificados.

J Pediatr (Rio J). 2004;80(2):119-22: Diarreia infantil, rotavírus, genótipo, seguimentos, estudos prospectivos.

Abstract

Objective: To identify rotavirus A and the most prevalent G and P genotypes in children with acute diarrhea, and to describe the occurrence of rotavirus infection and reinfection.

Methods: Group A rotavirus specimens were obtained from fecal samples from children with acute diarrhea in Goiânia, state of Goiás, Brazil from July 2000 to October 2002. Rotavirus A positive children and a control group (children of the same age and sex, without diarrhea and with no evidence of rotavirus in the first fecal samples) were followed prospectively during one year. All rotavirus A positive samples were genotyped using RT-PCR/nested-PCR.

Results: A total of 77 group A rotavirus strains (37.2%) were identified in the diarrheic samples of 207 children. The following G genotypes were identified: G1 (62.3%), G9 (34.4%) and G4 (3.3%). With regard to P genotyping, 59% were characterized as P[8], 7.7% as P[6], 23.1% as P[6]+P[8], 7.7% as P[4]+P[8] and 2.6% as P[4]+P[6]. The following associations were observed: G1P[8] (77.8%), G9P[8] (11.1%), G4P[8] (5.6%) and G1P[6] (5.6%). No reinfection was observed in the 40 rotavirus A (+) children. However, but two of 40 children who were initially negative for this agent developed rotavirus infection during the same period.

Conclusions: The predominant G and P genotypes observed were similar to those found in new vaccines. No reinfection occurred during one-year of follow-up for any of the genotypes identified.

J Pediatr (Rio J). 2004;80(2):119-22: Diarrhea, infantile, rotavirus, genotype, prospective studies.

Casística e métodos

Foram estudadas 207 crianças com doença diarréica aguda, provenientes do atendimento nos prontos-socorros e enfermarias do Departamento de Pediatria e Puericultura da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás e do Hospital Materno Infantil de Goiânia - Goiás, durante o período de julho de 2000 a outubro de 2002. Foi adotado como critério de inclusão a presença de doença diarréica aguda, considerada como a eliminação de três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas por dia. Os responsáveis pelos pacientes que preencheram o critério de inclusão foram esclarecidos sobre o estudo e, concordando com a participação da criança, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Em ambos os grupos, avaliou-se a ocorrência de episódios diarréicos, associados ou não a reinfecções sintomáticas ou assintomáticas por rotavírus, durante o período de estudo, através da coleta das amostras fecais para a identificação dos rotavírus, no dia zero (admissão ao estudo), e a seguir mensalmente durante um ano de seguimento (além da coleta durante os episódios de diarréia aguda) das crianças dos grupos *Rotavirus A* positivo e controle. Os rotavírus foram identificados em amostras fecais através da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)¹⁶ e pelo ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus (EIERA)¹⁷.

A determinação de genótipos de *Rotavirus A* foi feita pela reação em cadeia pela polimerase e pela reação de *Nested-PCR* para detecção dos segmentos genômicos codificantes das proteínas VP4 (genótipos P) e VP7 (genótipos G). A realização da primeira reação de amplificação (*RT-PCR*) utilizou os *primers* consensuais 9con1/9con2 (genotipagem G) e 4con2/4con3 (genotipagem P). Na reação seqüencial de *Nested-PCR*, foi utilizada a mistura de iniciadores específicos para a identificação dos genótipos G1, G2, G3, G4, G5, G8, G9 e G10, bem como para a identificação dos genótipos P[4], P[6], P[8], P[9] e P[10]. Após a amplificação, os produtos obtidos de cada amostra fecal através do *RT-PCR* e da *Nested-PCR* foram aplicados em gel de agarose, visualizados em transluminador com luz ultravioleta e analisados em comparação com o padrão de peso molecular utilizado.

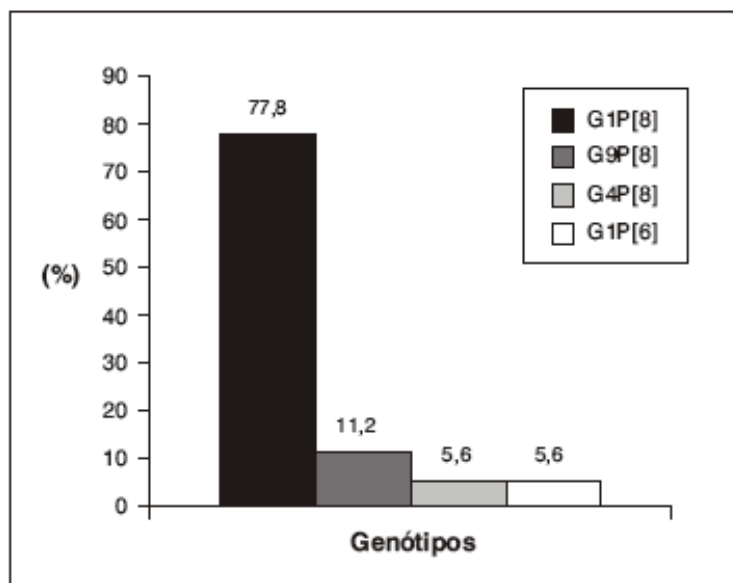


Figura 1 - Distribuição das 18 amostras de *Rotavirus A* identificadas com genotipagem G e P durante todo o período de coleta

Referências

- <http://conceptoazul.com.ec/pages/kitsport.html>
- <http://www.pcrstation.com/nested-pcr/>
- <http://pcr-elisa.blogspot.com.br/>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Nested_polymerase_chain_reaction
- http://www.pcrlinks.com/variants/pcr_elisa.htm
- <http://www.btc-bti.com/pcrelisa.htm>
- http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822007000200013&script=sci_arttext&tlng=e%21n#tab02

Obrigada!