
AVANÇOS BIOTECNOLÓGICOS

PARA O DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS INFECCIOSAS

E PARASITÁRIAS

Milena de Paiva Cavalcanti, Virginia Maria Barros de Lorena e Yara de Miranda Gomes¹

RESUMO

Os recentes surtos epidêmicos de doenças emergentes e reemergentes têm demonstrado a importância da aplicação de medidas de controle e prevenção. Para que tais medidas sejam eficazes, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico acurados é essencial. Os métodos decorrentes do aprimoramento da biologia molecular e celular têm propiciado a utilização de técnicas diagnósticas que produzem um resultado confiável em poucos minutos ou horas. Os ensaios imunocromatográficos, a PCR e suas variações, a tecnologia de microarranjos de DNA, a citometria de fluxo e a análise do proteoma constituem exemplos. Alguns desses métodos já estão disponíveis em laboratórios, especialmente os da rede privada. Contudo, a interpretação dos resultados requer níveis diferentes de conhecimento, o que torna necessária a capacitação de recursos humanos para sua maior difusão e aproveitamento. Espera-se, portanto, que o surgimento de novas tecnologias resulte no desenvolvimento de novas drogas e terapias e, sobretudo, de métodos diagnósticos que auxiliem a investigação epidemiológica e promovam melhorias na qualidade de vida da população ao se implantar rapidamente o tratamento.

DESCRITORES: Diagnóstico. Biotecnologias. Microrganismos.

INTRODUÇÃO

Muitas doenças infecciosas comuns nos países em desenvolvimento são tratáveis e o acesso às drogas tem diminuído significativamente a mortalidade e a morbidade nas populações (37). Uma intervenção correta, que seja eficaz tanto para os cuidados agudos como para uma fase seguinte de doenças emergentes e

1 Laboratório de Imunoparasitologia, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/CPqAM, Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz, Recife, PE, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Yara de Miranda Gomes, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Av. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-420, Recife, PE, Brasil. E-mail: yara@cpqam.fiocruz.br

Recebido para publicação em: 10/9/2007. Revisto em: 11/3/2008. Aceito em: 26/3/2008.

reemergentes, depende da detecção rápida e segura do agente patógeno. A recente síndrome respiratória aguda severa (SARS), por exemplo, demonstra a importância do diagnóstico rápido para a tomada de decisões com relação a triagem de pacientes, controle da infecção, tratamento e vacinação, que podem resultar em vida ou morte para a população (79). Além disso, métodos de diagnóstico mais rápidos certamente auxiliarão a vigilância epidemiológica, pois doenças infecciosas que apresentem significantes conseqüências para a saúde pública poderão ser eficientemente controladas se identificadas precocemente. Atualmente o mundo tem voltado as atenções para dengue hemorrágica, febre do Nilo e malária (30, 48).

Além dos esforços para controlar as doenças epidêmicas e endêmicas, ainda existe uma grande preocupação com a detecção de agentes de bioterrorismo. O trágico evento ocorrido nos Estados Unidos em 2001, quando esporos de anthrax foram enviados por via postal, embora tenha sido terrível, teve um efeito positivo para o desenvolvimento de novos métodos de detecção rápida de microrganismos que causam doenças fatais (14). Em um curto período de tempo, cientistas do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) desenvolveram com sucesso a PCR em tempo real (*real-time PCR*) para detecção de agentes de bioterrorismo, método esse agora disponível em muitos laboratórios (14).

As técnicas tradicionais de diagnóstico laboratorial incluem os métodos diretos, como a identificação direta do microrganismo por meio da microscopia óptica, e métodos indiretos, como a inoculação de amostras potencialmente infectadas em animais e meios de cultura e a detecção e quantificação de anticorpos e/ou antígenos em espécimes clínicos.

Historicamente, a microscopia óptica tem sido bastante utilizada no diagnóstico das infecções parasitárias por ser um método simples e que não necessita de reagentes e equipamentos sofisticados. A precisão do resultado, no entanto, depende de capacitação adequada do microscopista, tornando-o, em alguns casos, um teste subjetivo.

O cultivo continua sendo o principal método de diagnóstico para doenças bacterianas. Possibilita determinar a sensibilidade microbiana, porém necessita de tempo, muitas vezes crucial para o tratamento do paciente, e de uma infra-estrutura laboratorial mínima, além de meios de cultura especializados, recursos raros em locais onde as infecções são endêmicas (37).

Nos últimos vinte anos, o desenvolvimento dos métodos rápidos de diagnóstico proporcionou um avanço importante, pois os resultados podem ser obtidos em poucas horas ou até mesmo em minutos. A maior parte desses métodos baseia-se na detecção do complexo antígeno-anticorpo. A imunocromatografia tem sido bastante utilizada para diagnóstico em campo. Por outro lado, no laboratório outros métodos imunológicos são utilizados graças à simplicidade da execução, ao baixo custo e à acurácia (51, 59), como se verá mais adiante.

Técnicas de biologia molecular têm sido amplamente aplicadas no diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias (79). A revolucionária reação

em cadeia da polimerase (*polimerase chain reaction* – PCR) reproduz *in vitro* a replicação da molécula de DNA em grande escala e, de todas as técnicas moleculares, esta é considerada a mais desenvolvida (75, 79). Diferentemente dos métodos imunológicos, nos quais se identifica a doença por meio dos anticorpos dirigidos aos microrganismos, os métodos moleculares evidenciam a molécula do DNA na amostra do paciente. Em muitos casos, porém, a detecção da molécula de DNA do microrganismo na amostra clínica não indica, necessariamente, a confirmação da enfermidade (42).

Esta breve atualização discute os principais métodos utilizados para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias e os avanços alcançados com a biologia molecular, principalmente com as técnicas baseadas em PCR. Além disso, são discutidas outras metodologias que se mostram como uma promessa para o diagnóstico no futuro.

MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Nos anos 70, as pesquisas para o desenvolvimento de um método simples, porém sensível, para a detecção de antígenos do patógeno ou anticorpos específicos produzidos pelo hospedeiro levaram ao desenvolvimento do ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (20). O princípio básico da técnica consiste na imobilização de um dos reagentes (anticorpo ou antígeno) em uma fase sólida. Após a adição da amostra, o outro reagente ligado a uma enzima reagirá com o complexo antígeno-anticorpo. Os imunocomplexos são revelados ao adicionar-se o substrato da enzima e um cromógeno formando um produto colorido. Os resultados do ELISA são expressos objetivamente pelas absorbâncias obtidas de espectrofotômetros, não dependendo de leituras subjetivas.

Atualmente várias doenças infecciosas e parasitárias são pesquisadas pelos métodos imunológicos, sobretudo o ELISA (51). Graças à sua simplicidade (possibilidade de automação) pode ser usado para analisar grande número de indivíduos com um volume pequeno de amostra. É, portanto, o principal método usado em serviços de hemoterapia para a triagem de doadores (27, 78) e para o diagnóstico etiológico. A principal desvantagem dessa abordagem é a especificidade diminuída, pois a maioria dos conjuntos diagnósticos envolve a pesquisa de anticorpos utilizando extratos totais do organismo adsorvidos à placa (59). Este é um dos problemas verificados no diagnóstico sorológico da doença de Chagas, que apresenta uma importante reação cruzada em soros de pacientes com leishmaniose (3, 36). Uma forma de minimizar a obtenção desses resultados é a utilização de antígenos purificados, recombinantes ou sintéticos. Esses antígenos devem estar presentes em isolados de diferentes áreas endêmicas e ausentes em outros agentes infecciosos; devem ser imunogênicos em populações com diferentes *backgrounds* genéticos, independentemente da fase clínica da doença, além de estáveis e de fácil obtenção (81).

Em inquéritos epidemiológicos, sobretudo para a utilização em campo, a necessidade de testes rápidos para o diagnóstico das doenças contribuiu para o desenvolvimento dos testes do tipo *dipstick*, baseados em ensaios imunocromatográficos. A imunocromatografia é uma técnica que começou a ser desenvolvida nos anos 60, sendo primeiro criada para o estudo das proteínas séricas (31). Nesses ensaios é utilizada uma matriz de membrana de nitrocelulose ligada a uma tira de acetato transparente. Para detectar antígeno, emprega-se um anticorpo de captura, ligado à matriz e um anticorpo marcado específico ao antígeno pesquisado. Para detectar anticorpo, utiliza-se um antígeno específico ligado à matriz e um anticorpo anti-imunoglobulina marcado (59). O método *dipstick* fornece resultados qualitativos, rápidos, econômicos e de fácil interpretação; a leitura é feita a olho nu, fazendo-se uma comparação com os controles positivos e negativos (63).

Nas últimas décadas, *dipsticks* foram desenvolvidos para a detecção de muitas doenças infecciosas tais como dengue (2), malária (4), amebíase (8), peste bubônica (13), giardíase (24), leishmaniose visceral (26), hepatite B (61) e infecção por HIV (1), *Legionella pneumophila* (74), *Cryptosporidium parvum* (24), *Helicobacter pylori* (43), *Streptococcus pneumoniae* (18), entre outras. Esses testes são, portanto, de grande valor em situações nas quais os profissionais de saúde necessitem tomar decisões e assumir condutas imediatas como, por exemplo, no início de quimioprofilaxia para HIV em casos de exposição ocupacional a sangue e fluidos corpóreos e de parturientes que não realizaram pré-natal.

Embora os testes imunológicos sejam bastante utilizados na rotina laboratorial, resultados inconclusivos ainda são evidenciados. Nesse sentido, o diagnóstico molecular vem revolucionando a prática clínica das doenças infecciosas (79). Até o início da década de 1970, para os bioquímicos, o DNA era a molécula da célula mais difícil de ser analisada. Hoje a situação mudou de forma significativa. Técnicas como a hibridização, a amplificação e o seqüenciamento de nucleotídeos têm propiciado novos testes para um melhor conhecimento de diversos processos biológicos, alcançando grande importância clínica quando utilizados no diagnóstico laboratorial (22).

MÉTODOS MOLECULARES

Nos últimos anos, a genética, a biologia celular, o seqüenciamento do genoma de patógenos, entre outros recursos, têm mudado de forma significativa as oportunidades para a realização de investigações epidemiológicas, estudos da patogênese, diagnóstico e controle de doenças microbianas. Em 1983, o desenvolvimento da PCR por Kary B. Mullis (46, 47) foi considerado o grande avanço da biologia molecular. Em razão do alcance da popularidade da técnica, Kary B. Mullis recebeu o prêmio Nobel de Química em 1993. Esta técnica ampliou as possibilidades da análise de DNA e fez com que a biologia molecular encontrasse novas aplicações até mesmo em áreas fora do seu campo tradicional, tais como

a medicina, a agricultura e a biotecnologia. A ecologia molecular, a arqueologia biomolecular e a ciência forense de DNA são apenas três das novas disciplinas que surgiram como uma consequência direta da invenção da PCR.

A PCR reproduz *in vitro* a habilidade natural de replicação do DNA, podendo ser repetida em larga escala. A metodologia requer, primeiramente, o conhecimento, pelo menos parcial, do DNA alvo de um determinado organismo para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) ou de sondas que irão hibridizar-se especificamente com a sequência alvo (79). Com o aumento do número de genomas de patógenos sendo seqüenciados, catálogos de genes podem ser explorados para o desenvolvimento de testes diagnósticos baseados em PCR. Como resultado, desde a década passada, encontram-se disponíveis comercialmente muitos ensaios baseados nesta técnica, os quais continuam a expandir-se. Neste contexto, o *Food and Drug Administration* (FDA), agência governamental dos Estados Unidos responsável pela inspeção de produtos médicos e alimentícios, aprovou a utilização de ensaios baseados em PCR para a detecção de vários patógenos como, por exemplo, *Chlamydia trachomatis*, Citomegalovírus, *Gardnerella vaginalis*, HIV, HPV, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*, entre outros (79).

Variações da PCR

Quando se quer utilizar a PCR para a detecção de um agente viral, é importante levar em consideração que os genomas de muitos vírus de importância clínica são compostos de RNA ao invés de DNA. Nesse caso, é necessária a realização da transcrição reversa antes de se iniciar a amplificação por PCR, a qual é realizada tratando-se a amostra com a enzima transcriptase reversa. Esta enzima é capaz de transformar o RNA em um DNA complementar que servirá de alvo para a PCR convencional. A técnica é conhecida como RT-PCR (*reverse transcriptase-PCR*) (79).

A possibilidade de utilização, na mesma reação, de mais de um par de iniciadores com amplificação simultânea de múltiplas seqüências do DNA-alvo é chamada de *multiplex-PCR*. Assim, mais de uma seqüência de DNA, em uma mesma amostra, podem ser amplificadas ao mesmo tempo (7, 12, 25, 53) (Figura 1).

A *nested-PCR* utiliza dois pares de iniciadores para amplificação (Figura 1). O primeiro par é usado para uma primeira reação, na qual os produtos desta reação são submetidos a uma segunda amplificação com um outro par de iniciadores. Essa reamplificação aumenta a sensibilidade e a especificidade da técnica, porém apresenta problemas de contaminação, pois os tubos precisam ser abertos para a adição dos reagentes da segunda reação. Uma forma de contornar essa situação foi a padronização da *nested-PCR* no mesmo tubo (*single tube nested-PCR*), que consiste no seqüestro de um dos componentes da primeira etapa de reação, o qual foi aplicado com sucesso para a detecção do vírus causador da SARS (66).

PCR		
Nested PCR	PCR em tempo real	Multiplex PCR
<ul style="list-style-type: none"> • Reamplificação de uma região interna ao alvo • Maior especificidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de sondas fluorescentes • Mais rápido • Maior sensibilidade • Capacidade quantitativa 	<ul style="list-style-type: none"> • Uso de mais de um par de iniciadores • Maior sensibilidade

Figura 1. Resumo das variações da PCR e suas principais características.

Um significativo avanço biotecnológico para o diagnóstico das doenças infecciosas foi o desenvolvimento da PCR em tempo real. O sistema é baseado no uso de corantes ou sondas fluorescentes que permitem o monitoramento do produto amplificado como, por exemplo, a SYBR-Green I, que se liga inespecificamente a fitas duplas de DNA geradas durante a amplificação. Uma alternativa é o uso de uma sonda dirigida especificamente a uma região interna da seqüência que se deseja amplificar. Um exemplo desse sistema é a sonda TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp.). À medida que vai ocorrendo a amplificação, a TaqMan vai sendo degradada e há a liberação de um fluorocromo que absorve energia e emite luz (45, 79). A análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso e um amplificador de sinal, que traçam um gráfico com a absorção obtida após cada ciclo da PCR. O ciclo em que o limite de negatividade é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado (45).

A PCR em tempo real possibilita a eliminação da etapa laboriosa pós-amplificação (preparo do gel para eletroforese), convencionalmente necessária para visualização do produto amplificado. As vantagens da PCR em tempo real em relação a PCR convencional são inúmeras e incluem: velocidade, reprodutibilidade e capacidade de quantificação (65, 79). Essa tecnologia, que é altamente sensível, já está sendo desenvolvida para fazer o acompanhamento de inúmeras doenças como Aids, hepatite C, toxoplasmose e leishmanioses (23, 29, 38, 39, 40, 49, 52, 62).

A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica inovadora, capaz de promover a quantificação acurada e o monitoramento em tempo real do produto amplificado. O sistema de quantificação possui aplicações variadas: identificação de alelos em DNA genômico; análise de seqüências virais, bacterianas ou de protozoários a partir de várias fontes; análise de patógenos em alimentos; análise de produtos transgênicos, além de sua aplicação em diagnóstico (50). Muitos alvos podem ser monitorados usando-se fluorocromos com diferentes espectros de emissão. Essa tecnologia altamente sensível é comercialmente disponível com os sistemas TaqMan (Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corp.), LightCycler (Roche Diagnostics Corp.) e Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) (52).

Com relação à leishmaniose visceral, a técnica vem sendo utilizada em cães e em pacientes humanos, possibilitando a realização de estudos relacionados à

carga parasitária, à interação hospedeiro-parasito e ao monitoramento da terapia (23, 40, 45, 49, 57, 58, 70, 76). Mary et al. (40) demonstraram uma boa correlação entre a quantificação de *Leishmania infantum* em amostras de sangue e o estado clínico dos pacientes, permitindo discriminar pacientes sintomáticos, pacientes curados e portadores assintomáticos, o que promove o diagnóstico e o monitoramento da terapia com segurança, rapidez e conforto para o paciente.

Estudo recente de Kompalic-Cristo et al. (29) examinou o valor diagnóstico da PCR em tempo real para detectar e quantificar *Toxoplasma gondii* em sangue humano. Concluiu que o sistema é capaz de quantificar, acuradamente, leituras parasitárias de DNA de *T. gondii* em baixas concentrações, podendo verificar um aumento no número de parasitos em indivíduos sorologicamente identificados com toxoplasmose aguda.

Em medicina veterinária, sistemas que utilizam Sybr Green têm sido aplicados, em modelo experimental, para quantificação de *Borrelia burgdorferi* para a doença de Lyme (44) e o diagnóstico da ehrlichiose (19).

Atualmente existem conjuntos diagnósticos disponíveis para a detecção e quantificação de DNA e RNA em amostras clínicas, especialmente desenvolvidos para o acompanhamento de pacientes com HIV e hepatite C (52). Assim como a PCR foi definida por alguns autores como “padrão-ouro”, a quantitativa PCR em tempo-real certamente será a técnica de referência no futuro (40).

Apesar dos avanços tecnológicos, os métodos de amplificação da molécula de DNA apresentam limitações que incluem resultados falso-positivos, decorrentes de contaminação com DNA, e resultados falso-negativos relacionados com a presença de inibidores da PCR (79). Nos resultados falso-positivos, na maioria dos ensaios patógeno-específicos, a fonte predominante de contaminação é derivada de produtos amplificados em reações anteriores que podem ser transmitidos por meio dos reagentes, tubos, pipetas e bancadas. Boas práticas de laboratório e a separação física das áreas de pré-amplificação e pós-amplificação podem reduzir os riscos de contaminação, bem como a descontaminação dos materiais envolvidos na PCR por métodos que destroem o DNA incluindo irradiação ultravioleta, tratamento químico e digestão enzimática (11, 16). Resultados falso-negativos podem decorrer de um volume amostral relativamente abaixo do permissível para a reação, além de problemas associados com o processamento da PCR. Tais obstáculos podem ser superados com tratamento adequado da amostra por meio de uma correta extração e purificação do DNA e remoção dos inibidores da PCR, tais como hemoglobina, componentes da urina como leucócitos, células epiteliais e cristais, entre outros (79).

Nos últimos anos, novas técnicas moleculares de tipificação baseadas na PCR têm propiciado um importante avanço nos estudos de epidemiologia molecular das enfermidades infecciosas (21, 60). Um estudo epidemiológico molecular tem por objetivo determinar a relação clonal existente entre vários isolados de uma mesma espécie (21). Esta informação é muito útil, principalmente quando se produzem surtos epidêmicos causados por cepas multiresistentes, porque permite determinar o número de clones circulantes, identificar a fonte de contaminação, o reservatório e os veículos

de transmissão, avaliar a eficácia das medidas de controle para evitar a disseminação dos clones e diferenciar entre infecção e recidiva. O extraordinário avanço da biologia molecular tem propiciado o desenvolvimento de novos métodos genômicos de tipagem por meio de diversas técnicas, incluindo as baseadas na amplificação dos ácidos nucleicos, que possuem um elevado poder de discriminação, são mais rápidas e práticas e permitem trabalhar com um maior número de amostras (21).

PERSPECTIVAS FUTURAS

As seqüências descritas de mais de 1.000 vírus e 135 bactérias têm possibilitado o desenvolvimento de testes diagnósticos promissores (37). Esse grande avanço da biologia molecular e celular vem atuando em várias áreas da microbiologia. Os microarranjos de DNA (*DNA microarray*) vêm sendo usados para estudar a expressão dos genes dos agentes infecciosos e do hospedeiro em resposta à infecção e poderá resultar em descobertas de novos biomarcadores da doença ou de novos alvos para o diagnóstico (17). Os microarranjos de DNA são definidos como pequenos suportes sólidos nos quais milhares de sondas estão imobilizadas ou ligadas de forma organizada em posições conhecidas. Usualmente o suporte sólido é uma lâmina de vidro especial de microscopia, mas também pode ser um *chip* de silicone. O DNA é impresso, depositado ou sintetizado diretamente no suporte. Essas sondas podem ser produtos de PCR ou oligonucleotídeos e os alvos podem ser produtos de PCR, DNA genômico, RNA total, RNA amplificado, DNA complementar, DNA plasmidial ou, simplesmente, amostras clínicas (52). Estudos recentes têm mostrado a aplicação dos microarranjos de DNA na identificação de diversos microrganismos: vírus influenza e adenovírus (73, 34), *Entamoeba histolytica*, *E. dispar*, *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* (72).

A tecnologia de microarranjos de DNA apresenta-se como um método promissor para detecção de genes de resistência antimicrobiana e resistência mutacional (9). A detecção e identificação de genes de resistência à tetraciclina foram recentemente demonstradas por este método (10). Quando a PCR é usada para detecção de DNA em amostras clínicas, os microarranjos podem ser usados para identificar os produtos amplificados por hibridização com sondas patógeno-específicas (52). Um exemplo desta aplicação é a realização da PCR com iniciadores universais, capazes de detectar múltiplos patógenos simultaneamente e a utilização dos microarranjos para verificar a amplificação de uma bactéria ou vírus específico (32, 35). Adicionalmente, esse modelo vem sendo trabalhado para o desenvolvimento de um método para detecção de anticorpos específicos (*antigen microarrays for serology*). Nesse modelo, um arranjo de proteínas de vários agentes infecciosos estaria disponível para a ligação com anticorpos presentes em soro. Isso possibilitaria uma triagem sorológica completa do paciente. Já foi desenvolvido um microarranjo com antígenos específicos de *Toxoplasma gondii*, citomegalovírus, herpesvírus 1 e 2 e vírus da rubéola, cujos resultados foram favoráveis para a detecção de imunoglobulinas G (77).

A citometria de fluxo, desenvolvida nos anos 50, é um método automatizado para avaliar as propriedades ópticas (dispersão da luz e fluorescência) de partículas e/ou células que fluem numa suspensão líquida. O sistema operacional do citômetro de fluxo é constituído de fontes luminosas do tipo *laser* e de um conjunto de lentes que proporciona a avaliação de múltiplos parâmetros. Células variadas podem ser identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais conjugados à fluorocromos, que se ligam a antígenos da superfície celular ou intracitoplasmáticos. Quando a célula intersecta o *laser*, ocorre um processo de dispersão fotônica e/ou emissão de fluorescência. O tamanho e a complexidade celular (aspectos morfológicos) são avaliados mediante a dispersão luminosa frontal e lateral, respectivamente. Os sinais fluorescentes são decorrentes da positividade dos antígenos de membrana nas células examinadas que são captados, analisados e quantificados por um programa de computador (67).

A citometria de fluxo tem sido usada para quantificar antígenos virais dentro ou sobre superfícies de células infectadas. Além disso, ácidos nucleicos virais podem ser detectados e quantificados por hibridização *in situ* em suspensões celulares e, simultaneamente, a citometria pode, também, identificar fenotipicamente quais células estão infectadas (52). Isso tem sido utilizado para a pesquisa de muitos vírus, principalmente HIV e citomegalovírus (55).

Uma outra aplicação da citometria de fluxo é a detecção de imunoglobulinas específicas, presentes na amostra graças à utilização de microesferas ligadas aos antígenos dos microrganismos (55). Os anticorpos da amostra são detectados após a adição de um segundo anticorpo conjugado a um corante fluorescente (55). O sistema Luminex®, baseado neste método da citometria de fluxo, foi projetado para atender às necessidades da medicina do laboratório, porém vem sendo também utilizado no ambiente da pesquisa. Dessa forma, vários microrganismos podem ser detectados diretamente pelos citômetros de fluxo (52). Essa tecnologia já tem sido aplicada com sucesso para a identificação de um vasto número de bactérias presentes em sangue, urina, exudatos, bile, lavado brônquico e até em fezes (55). Recentemente, a pesquisa dos anticorpos específicos a HIV (52), vírus sincicial respiratório (69) a *Trypanosoma cruzi* (15, 71), a *Leishmania chagasi* (33), ao *Mycobacterium tuberculosis* (28), *Cryptosporidium hominis* e *C. parvum* (6), entre outros, tem sido realizada por esta metodologia (52).

A versatilidade da citometria de fluxo propicia um grande número de aplicações na microbiologia clínica e isso poderá ser visto em um futuro próximo. Os aparelhos são agora mais fáceis de utilizar e também mais econômicos. Além disso, segundo Raoult et al. (52), o desenvolvimento de citômetros portáteis poderá facilitar suas aplicações, por exemplo, em aeroportos e portos para a identificação rápida de doenças e a detecção de microrganismos usados como agentes de bioterrorismo.

A análise do proteoma (conjunto de todas as proteínas codificadas do genoma de um organismo) tem criado oportunidades para identificar as proteínas-alvo, que são expressas diferencialmente na saúde e na doença (64). Esses

novos conhecimentos estão relacionados às vias de sinalização celular, conjuntos de proteínas reguladoras, modificações pós-transducionais, bem como outras informações cruciais sobre os estados fisiológicos e fisiopatológicos de células e organismos (56). Atualmente, as principais técnicas utilizadas na proteômica são a eletroforese bidimensional e a espectrometria de massa. O aprimoramento dessas técnicas tem possibilitado a detecção de proteínas com alta sensibilidade e especificidade em pequenos volumes de amostra, como no sangue e na urina (41).

A proteômica tem trazido informações importantes sobre os microrganismos, auxiliando no desenvolvimento de novos métodos para diagnosticar, eficientemente, algumas doenças em estágios latentes e, assim, facilitar o tratamento e a cura dos pacientes. Proteínas secretadas foram identificadas em isolados clínicos comuns e analisadas como potenciais antígenos para o imunodiagnóstico da tuberculose, mostrando elevada sensibilidade e especificidade (5). Uma triagem sorológica que pudesse detectar a infecção pré-clínica da tuberculose permitiria o tratamento precoce, reduzindo a transmissão da doença. Da mesma forma, por meio da análise do soro de pacientes com a síndrome respiratória aguda severa, foram identificadas proteínas que poderão ser usadas para o diagnóstico (54) e o desenvolvimento de vacinas (80).

Apesar de a maioria dos estudos a respeito da identificação e caracterização de marcadores biológicos específicos estar voltada para o diagnóstico de cânceres, Alzheimer e doenças autoimunes, a análise proteômica poderá ser útil para o diagnóstico precoce de doenças infecciosas e parasitárias e para o acompanhamento da evolução do tratamento. A utilização da espectrometria de massa para o diagnóstico de calicivírus tem sido proposta (68), porém ainda é uma promessa.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath (*in memoriam*), do CPqAM/Fiocruz, pela análise crítica da presente atualização. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Bio-Manguinhos/Fiocruz. Y.M. Gomes é detentora de bolsa de produtividade do CNPq. V.M.B. Lorena recebe bolsa de doutorado do CNPq e M.P. Cavalcanti foi bolsista na categoria doutorado desse mesmo órgão de fomento à pesquisa durante a realização deste trabalho.

ABSTRACT

Biotechnology advances for diagnosis of infectious and parasitic diseases

Recent epidemic outbreaks of emerging and re-emerging diseases have shown the importance of control and prevention measures. In order for such measures to be effective, the development of accurate diagnostic methods is relevant. Tools arising from improvements in molecular and cell biology have allowed for diagnostic techniques that produce reliable results in minutes or hours. Immunochromatographic assays, PCR and its variants, technology involving DNA

micro-arrays, flow cytometry, and proteome analysis are some examples. Some of these methods are already available in laboratories, especially in the private sector. However, the interpretation of results requires new levels of knowledge. There is, therefore, a need to train staff to ensure that these methods are more widely known and made use of. It is thereby expected that the emergence of new technologies will result in the development of new drugs and treatments, and especially in diagnostic methods for epidemiological investigations, and will lead to improvements in the quality of life of the population, as treatment will be able to be started promptly.

KEY WORDS: Diagnosis. Biotechnology. Microorganisms.

REFERÊNCIAS

1. Aidoo S, Ampofo WK, Brandful JA. Suitability of a rapid immunochromatographic test for detection of antibodies to human immunodeficiency virus in Ghana, West Africa. *J Clin Microbiol* 39 : 2572-2575, 2001.
2. Allwinn R, Schiefertein C, Clauke S, Doerr HW. Rapid diagnostic of primary dengue fever by the immunochromatographic test and by electron microscopy-a case report. *Infection* 27: 365-367, 1999.
3. Anderson J. Molecular diagnosis of experimental Chagas disease. *Trends in Parasitol* 20: 52-53, 2004.
4. Araz E, Tanyuksel M, Ardic N, Tabuk C. Performance of a commercial immunochromatographic test for the diagnosis of vivax malaria in Turkey. *R Soc Trop Med Hyg* 94: 55-56, 2000.
5. Bahk YY, Kim SA, Kim JS, Euh HJ, Bai GH, Cho SN, Kim YS. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis*: identification by proteomics approach and test for diagnostic marker. *Proteomics* 4: 3299-3307, 2004.
6. Bandyopadhyay K, Kellar KL, Moura I, Casaqui-Carollo MC, Graczyk TK, Slemenda S, Johnston SP, da Silva AJ. Rapid microsphere assay for identification of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* in stool and environmental samples. *J Clin Microbiol* 45: 2835-2840, 2007.
7. Bej AK, Mahbubani MH, Miller R, Dicesare JL, Haff L, Atlas RM. Multiplex PCR amplification and immobilized capture probes for detection of bacterial pathogens and indicators in water. *Mol Cell Probes* 4: 353-365, 1990.
8. Bhaskar S, Singh S, Sharma M. A single-step immunochromatographic test for the detection of *Entamoeba histolytica* in stool samples. *J Immunol Methods* 196: 193-198, 1996.
9. Bodrossy L, Sessitsch A. Oligonucleotide microarray in microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* 7: 245-254, 2004.
10. Call DR, Bakko MK, Roberts MC. Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microassays. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 3290-3295, 2003.
11. Carrol NM, Adamson P, Okhravi N. Elimination of bacterial DNA from Taq DNA polymerases by restriction endonuclease digestion. *J Clin Microbiol* 37: 3402-3404, 1999.
12. Chamberlain JL, Gibbs RA, Rainier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Detection screening of Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16: 11141-11156, 1988.
13. Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, Rasolomaharo M, Biosier P, O'brien T, Aldrich J, Keleher A, Morgan C, Burans J. Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assays and rapid immunogold dipstick. *Int J Med Microbiol* 290: 279-283, 2000.
14. Cockerill FR III, Smith TF. Response of clinical microbiology laboratory to emerging (new) and reemerging infectious diseases. *J Clin Microbiol* 42: 2359-2365, 2004.
15. Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Da Costa Rocha MO, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Romanha AJ. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 112-118, 2001.

16. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox A. Contamination and sensitivity issues with a real time universal 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 38: 1747-1752, 2000.
17. Cummings CA, Relman DA. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerg Infect Dis* 8: 13-525, 2000.
18. Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedrosa P, Prat C, Matas L, Ausina V. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 119: 243-249, 2001.
19. Edelman DC, Dumler JS. Evaluation of an improved PCR diagnostic assay for human granulocytic ehrlichiosis. *Mol Diagn* 1: 41-49, 1996.
20. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8: 871-874, 1971.
21. Fernández-Cuenca F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 22: 355-360, 2004.
22. Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico imunológico das principais doenças infecciosas e parasitárias*. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
23. Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego, Alberola J, Ferrer L, Aánchez A, Roura X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 137: 214-221, 2006.
24. Garcia LS, Shimizu RY. Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the ColorPAC Combination rapid solid-phase qualitative immunochromatographic assay. *J Clin Microbiol* 38: 1267-1268, 2000.
25. Geha DJ, Uhl JR, Gustaferro CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 32: 1768-1772. 1994.
26. Jelinek T, Eichenlaub S, Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 669-670, 1999.
27. Katti MK. Are enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot assay independent in immunodiagnosis of infectious disease? *Clin Infect Dis* 32: 1114, 2001.
28. Khan IH, Ravindran R, Yee J, Ziman M, Lewinsohn DM, Genaro L, Flynn JL, Goulding CW, DeRiemer K, Lerche NW, Luciw PA. Profiling Antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb.*) by Multiplex Microbead Suspension Arrays for Serodiagnosis of TB. *Clin Vaccine Immunol*. 2008, (in press).
29. Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez_Mutis M, Fernandes O, Britto C. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res* 101: 619-625, 2007.
30. Kortepeter MG, Parker W. Potential biological weapons threats. *Emerg Infect Dis* 5: 523-527, 1999.
31. Kohn J. An immunochromatographic technique. *Immunol* 15: 863-865, 1968.
32. Kricka LJ. Ultrasensitive immunoassay techniques. *Clin Biochem* 26: 325-331, 1993.
33. Lemos EM, Gomes IT, Carvalho SFG, Rocha RDR, Pissinate JF, Martins-Filho AO, Dietze R. Detection of anti-*Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* Immunoglobulin G by Flow Cytometry for cure assessment following chemotherapeutic treatment of American Visceral Leishmaniasis. *Clin Vaccine Immunol* 14: 569-576, 2007.
34. Lin B, Wang Z., Vora GL, Thornton JA, Schnur JM, Thach DC, Blaney KM, Ligler AG, Malanoski AP, Santiago J, Walter EA, Agan BK, Metzgar D, Seto D, Daum LT, Kruzelock R, Rowley RK, Hanson EH, Tibbetts C, Stenger DA. Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays. *Genome Res* 16: 527-535, 2006.
35. Liu W, Mirzabekov AD, Stahl DA. Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. *Environ Microbiol* 3: 619-629, 2001.
36. Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
37. Mabey D, Peeling RW, Uowski A, Perkins MD. Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol* 2: 231-240, 2004.

38. Manna L, Reale S, Viola E, Vitale F, Manzillo VF, Michele PL, Caracappa S, Gravino AE. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 142: 271-280, 2006.
39. Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM, Gravino AE. Real time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J* 2007 (In press).
40. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol* 42: 5249-5255, 2004.
41. Marsh GM, Kavallaris M. Proteomics and disease: opportunities and challenges. *The Med J Aust* 182: 575-579, 2005.
42. Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 189: 1018-1023, 2004.
43. Miwa H, Akamatsu S, Tachikawa T, Sogabe T, Ohtaka K, Nagahara A, Sugiyama Y, Sato N. On-site diagnosis of *H. pylori* infection by urine. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39: 95-97, 2001.
44. Morrison TB, Ma Y, Weis JH, Weis JJ. Rapid and sensitive quantification of *Borrelia burgdorferi*-infected mouse tissues by continuous fluorescence monitoring of PCR. *J Clin Microbiol* 37: 987-992, 1999.
45. Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. *Parasitol* 46: 163-167, 2004.
46. KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerase-catalyzed reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987.
47. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262: 56-65, 1990.
48. Nichol ST, Arikawa J, Kawaoka Y. Emerging viral diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12411-12412, 2000.
49. Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Leishmania in Mouse Tissues. *J Clin Microbiol* 40: 1666-1669, 2002.
50. Novais CM, Pires-Alves M, Silva FF. PCR em tempo real. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 33: 10-13, 2004.
51. Perusk AH, Peruski LF. Immunological methods for detection and Identification of Infectious disease and biological warfare agents. *Clin Diag Lab Immunol* 10: 506-513, 2003.
52. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* 2: 151-159, 2004.
53. Rea S, Chikuni K, Branciarri R, Sangamayya RS, Ranucci D, Avelline P. Use of duplex polymerase chain reaktion (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella cheese. *J Dairy Res* 68: 689-698, 2001.
54. Ren Y, He QY, Fan J, Jones B, Zhou Y, Xie Y, Cheung C, Wu A, Chiu J, Peiris JSM, Tam PKH. The use of proteomics in the discovery of serum biomarkers from patients with severe acute respiratory syndrome. *Proteomics* 4: 3477-3484, 2004.
55. P, Crapoulet N, Ogata H, La Scola B, Vestris G, Claverie J, Raoult D. Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whippelii*. *Lancet* 362: 447-449, 2003.
56. Rocha TL, Costa PHA, Magalhães JCC, Evaristo RGS, Vasconcelos EAR, Coutinho MV, Paes NS, Silva MCM, Grossi-De-Sá MF. Eletroforese bidimensional e análise de proteomas. *Comunicado Técnico* 136, Embrapa, 2005.
57. Rolão N, Cortes S, Rodrigues OR, Campino L. Quantification of *Leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay. *J Parasitol* 90: 1150-1154, 2004.
58. Roura X, Sanchez L, Ferrer L. Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec* 144: 262-264, 1999.
59. Sanchez MCA. Testes sorológicos. In: Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-ímmunes 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
60. Schwarz S, Blinckwede M, Kehrenberg C, Michael GB. Phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of veterinary important bacterial pathogens of the genera *Staphylococcus*, *Salmonella*, and *Pasteurella*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 116: 401-416, 2003.

61. Shin HS, Kim CK, Shin KS, Chung HK, Heo TR. Pretreatment of whole blood for use in immunochromatographic assays for hepatitis B virus surface antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 9-13, 2001.
62. Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol* 147: 315-319, 2007.
63. Spielberg F, Kassler WJ. Rapid testing for HIV antibody: a technology whose time has come. *Ann Intern Med* 125: 509-511, 1996.
64. Suresh S, Huhane S, Meshra G, Hanumanthu GR, Suresh M, Reddy R, Pandey A. Proteomic resources: Integrating biomedical information in humans. *Gene* 364: 13-18, 2005.
65. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen BC, Haaheim H, Hjelmvoll S, Littauer P, Dahl K H. Genetics methods for detection of antimicrobial resistance. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 112: 815-837, 2004.
66. Tao SC, Jiang D, Lu HL, Xing WL, Zhou YX, Cheng J. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus. *Biotechnol Lett* 26: 179-183, 2004.
67. Traganos F. Flow cytometry: Principles and applications. *Cancer Invest* 2: 239-258, 1994.
68. Utagawa E, Nakazawa E, Matsuo K, Oishi I, Takeda N, Miyamura T. Application of an automated specimen search system installed in a transmission electron microscope for the detection of caliciviruses in clinical specimens. *J Virol Methods* 100: 49-56, 2002.
69. Vieira SE, Glio AE, Durigon EL, Ejzenberg B. Lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus in infants: the role played by specific antibodies. *Clinics* 62: 709-716, 2007.
70. Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S. TaqMan-Based Detection of *Leishmania infantum* DNA Using Canine Samples. *New York Acad Sci* 1026: 139-143, 2004.
71. Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Wendling APB, Rocha RDR, Teixeira-Carvalho A, Martins NE, Dias JCP, Rassi A, Luquetti AO, Elói-Santos SM, Martins-Filho OA. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G in the clinical laboratory. *J Immunol Methods* 318: 102-112, 2007.
72. Wang Z, Vora GJ, Stenger DA. Detection and genotyping of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* by oligonucleotide microarray. *J Clin Microbiol* 42: 3262-3271, 2004.
73. Wang Z, Daum LT, Vora GJ, Metzgar D, walter EA, canas LC, Malanoski AP, Lin B, Stenger DA. Identifying influenza viruses with resequencing microarrays. *Emerg Infect Dis* 12: 638-648, 2006.
74. Weaver PC, Yzerman EP, Kuijper KJ, Speeman P, Dankert J. Rapid diagnosis of Legionnaires disease using an immunochromatographic assays for *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in urine during an outbreak in The Netherlands. *J Clin Microb* 38: 2738-2739, 2000.
75. Weng L, Rubin EM, Bristow J. Application of sequence-based methods in human microbial ecology. *Genome Res* 16: 316-322, 2006.
76. Wortmann GW, Romero LI, Paz HM, Ortega-Barria E, Bayard V, Hochberg LP, Ryan JR. Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 148-151, 2004.
77. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271, 1987.
78. Wright PF, Nilsson EMV, Rooij ML, Jeggo MH. Standardization and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev Sci Tech* 12: 435-450, 1993.
79. Yang S, Rothman R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. *Lancet* 4: 337-348, 2004.
80. Ying W, Hao Y, Zhang Y, Peng W, Qin E, Cai Y, Wei K, Chang JWG, Sun W, Dai S, Li X, Zhu Y, Li J, Wu S, Guo L, Dai J, Wang J, Wan P, Chen T, Du C, Li D, Wan J, Kuai X, Li W, Shi R, Wei H, Cao C, Yu M, Liu H, Dong F, Wang D, Zhang X, Qian X, Zhu O, He F. Proteomic analysis on structural proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Proteomic* 4: 492-504, 2004.
81. Zingales B, Gruber A, Ramalho CB, Umezawa ES, Colli W. Use of recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85: 519-522, 1990.