

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UniCEUB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA**

ANA CAROLINA HORTENCIO GARCIA

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS

Trabalho de conclusão de curso apresentado em forma de artigo como requisito parcial ao curso de bacharelado em Biomedicina do UniCEUB sob orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Martins Queiroz

Agradecimentos

“Amar muitas coisas, por aí que reside a verdadeira força, e quem ama muito executa muito, e pode realizar muito mais, e aquilo que é feito com amor é bem feito.”

Vincent van Gogh

Com essa frase do meu pintor favorito, inicio os agradecimentos com a convicção de ter sido cercada com muito amor para a realização deste trabalho e me transbordo em gratidão por todos que direta ou indiretamente me influenciam a ser uma pessoa melhor.

Agradeço aos meus pais, Maria Isabel Hortencio e Honoro Neves, por estarem nessa luta diária comigo, me apoiando em todos os momentos, sendo minha fortaleza e ponto de equilíbrio. Amo vocês!

Ao meu querido orientador, Paulo Roberto Queiroz, que tem um papel ímpar na minha vida acadêmica. Agradeço por ter sido meu mentor, mestre e amigo, por todas as oportunidades que me concedeu e os conselhos que me guiaram para a melhor versão de mim mesma. Espero ser um dia uma profissional tão excelente quanto o senhor.

Aos meus irmãos, André e Ivan, cunhadas e todos os meus familiares que me desejaram força e me incentivaram e entenderam minhas ausências por causa dos estudos. Eu os amo, mais do que que imaginam!

A minha amiga, Dra. Briana Cardoso, por ser um exemplo de profissional para mim. Obrigada por toda a paciência e generosidade comigo dentro e fora do laboratório.

Ao Dr. Claudiner Oliveira, pelas sugestões que fez ao meu trabalho e pelos ensinamentos tanto profissionais quanto pessoais.

Às professoras Maria Creuza Barros e Anabele Azevedo Lima que compõem a banca que avalia este trabalho e que são verdadeiras inspirações de mulheres fortes, inteligentes e profissionais. Muito obrigada pela confiança que depositaram em mim e por tudo que me ensinaram! Agradeço também ao prof. Bruno Milagres, ao prof. Luis Eduardo Barros, e a prof. Fernanda Vinhaes que me incentivaram sempre e não me deixaram desistir me fazendo enxergar o quanto sou capaz. E assim a todos os professores do UniCEUB que em sua excelência deixaram comigo ensinamentos que levarei por toda a vida, vocês são os melhores mestres que alguém poderia ter.

Por fim, agradeço todos os meus amigos que não me deixaram desistir e me acompanharam de perto aguentando meu estresse e medo, em especial: Esther Ferreira, João Paulo Romualdo, Juliana Oliveira, Katherine Schneider, Luíze Foizer, Maitê Kolarik, Natan Carvalho, Nathalia Oliveira, Sarah Maria Napoleão, Sarah Marillyn Silvério, Vanessa Iris Medeiros e Viviane Rodrigues. Levarei para sempre comigo nossas memórias juntos.

A todos os profissionais do CEUB, e demais pessoas que não foram citadas, mas estão no meu coração, obrigada por tudo.

Finalizo dedicando este singelo trabalho a todas as pessoas que dedicam sua vida a ciência por acreditarem que podem fazer do mundo um lugar melhor.

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE DOENÇAS INFECTOCONTAGIOSAS

Ana Carolina Hortencio Garcia¹

Paulo Roberto Martins Queiroz ²

Resumo: A aplicação das técnicas de PCR para o diagnóstico molecular tem demonstrado ser altamente efetiva, principalmente para doenças cujo diagnóstico precoce é decisivo no sucesso do tratamento, ou ainda de patologias com etiologia de difícil detecção. O objetivo deste trabalho foi apresentar as vantagens da utilização de metodologias moleculares, em especial a PCR, como diagnóstico de doenças infectocontagiosas de etiologia variada. Para tal, foi realizada uma revisão bibliográfica em formato narrativo. Cada etiologia foi representada por uma doença, escolhidas em função de sua importância epidemiológica, sendo elas o HIV, a influenza, candidemias, toxoplasmose e tuberculose. Foram abordados a definição da doença em questão, sua situação epidemiológica, o diagnóstico convencional e a detecção molecular.

Palavras-Chave: Diagnóstico molecular. Biologia molecular. Reação em Cadeia da Polimerase. HIV. Influenza. Candida. Toxoplasmose. Tuberculose.

MOLECULAR IDENTIFICATION METHODS OF INFECTIOUS DISEASES

Abstract: The application of PCR techniques in molecular diagnosis has shown a high efficiency, especially for diseases whose early diagnosis is decisive in the treatment's success or in pathologies with difficult etiology detection. The aim of this work was to present the advantages provided by molecular methodologies, especially PCR, in the diagnosis of infecto-contagious diseases of many etiologies. For this, a narrative literature review was carried out. Each etiology was represented by a disease, chosen according to its epidemiological relevance: HIV, influenza, candidemia, toxoplasmosis and tuberculosis. The definition of the disease, its epidemiological situation, the conventional diagnosis and its molecular detection were discussed.

Keywords: Molecular diagnostics. Molecular biology. Polymerase chain reaction. HIV. Influenza. Candida. Toxoplasmosis. Tuberculosis.

¹ Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília-UniCEUB. carol.hortencio@hotmail.com

² Biólogo, MsC em Biologia Molecular-UnB, Dr. em Biologia Animal-UnB, professor de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília-UniCEUB. paulo.silva@ceub.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Ao se tratar de patologias, a correta identificação do microrganismo causador da doença é de suma importância. Durante epidemias de influenza e dengue, por exemplo, a identificação etiológica possibilita ações preventivas e de urgência. A ausência do diagnóstico etiológico estimula a prática de tratamento empírico, uma abordagem terapêutica que leva ao uso indiscriminado de antimicrobianos e seleciona microrganismos resistentes, tornando tratamentos posteriores mais complicados e caros. O diagnóstico laboratorial de doenças infecciosas que são aquelas causadas por vírus, bactérias, fungos ou parasitas, baseia-se normalmente no isolamento do organismo patogênico e identificação por observação da morfologia em microscopia óptica ou testes bioquímicos de detecção de atividade enzimática ou ainda de crescimento em meios de cultura seletivos para o caso de bactérias e fungos (CAVALCANTI et al., 2008; SIQUEIRA, 2012; SILVA; JÚNIOR, 2015).

Contudo, alguns problemas podem ser relacionados a estas metodologias consideradas padrão ouro de diagnóstico, como a demora na obtenção do resultado e, em alguns casos, imprecisão da análise, que pode comprometer o início da terapia adequada contra o patógeno. As técnicas que utilizam ácidos nucleicos, permitindo a identificação de sequências específicas de DNA, abrem perspectivas na identificação laboratorial rápida de agentes patogênicos com elevada especificidade e sensibilidade, parâmetros muito desejáveis no que diz respeito à análise clínica, sem necessidade de localizar microrganismos viáveis na amostra biológica. No entanto, a implementação desta tecnologia tem enfrentado o problema dos elevados custos dos equipamentos e reagentes (SANTOS et al., 2012; KONEMAN et al., 2014; HAAS; TORRES, 2016).

A biologia molecular se desenvolveu durante o século XX trazendo grandes avanços para a compreensão acerca do desenvolvimento celular, da replicação do DNA e funcionamento dos genes. A descoberta da estrutura em dupla hélice do DNA, das metodologias do DNA recombinante e o descobrimento de novas metodologias como o sequenciamento genômico foram grandes marcos na história da ciência e que possibilitaram o surgimento do diagnóstico molecular (VALONES et al., 2009). A revolucionária técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permitiu o estudo de sequências de ácidos nucleicos, proporcionando avanços suntuosos para áreas como a genética, medicina forense, sequenciamento do genoma humano e microbiano (MOLINA; TOBO, 2004).

Na área da medicina, o uso desta técnica elevadamente sensível e específica é aliada no controle das principais doenças de acometimento humano e animal. A PCR foi desenvolvida pelo bioquímico Kary Mullis, e obteve o reconhecimento do prêmio Nobel de química em 1993 (HAAS; TORRES, 2016). A técnica baseia-se na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de DNA, em que a partir de uma única molécula

do ácido nucléico, é possível gerar bilhões de moléculas similares em uma reação imitando assim a replicação natural do DNA (MULLIS, 1990).

No momento atual existem muitas variações da PCR convencional, destacando-se a PCR em Tempo Real (qPCR - PCR quantitativo), RT-PCR (Transcriptase Reversa - PCR), utilizada para análise de RNA e a PCR Multiplex (CARMO; FIORINI, 2007). Análises em que são aplicados os princípios da PCR possibilitam a detecção de microrganismos que não podem ser cultivados ou que são de crescimento fastidioso, visto que tal técnica permite a detecção, pela amplificação, de um fragmento de DNA (ou indiretamente de RNA), o qual seja previamente determinado e conhecido. Uma quantidade significativa de microrganismos de importância clínica já foram elucidados e identificados pela PCR (KONEMAN et al., 2014).

Os laboratórios clínicos têm se adaptado nas últimas décadas para acompanhar o progresso científico e tecnológico. O avanço da ciência e da medicina trouxe a imprescindibilidade de se obter métodos que gerem diagnósticos mais precisos, rápidos e mais sensíveis, o que geralmente implica em maiores custos (MUGNOL; FERRAZ, 2006). Segundo as recentes publicações a respeito do diagnóstico molecular de doenças infecciosas, nota-se que esse procedimento cada vez mais é aperfeiçoado, indicando vantagens, quando comparados aos métodos fenotípicos convencionais (VALONES et al., 2009).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi apresentar as vantagens da utilização de metodologias moleculares, em especial a PCR, como diagnóstico de doenças infectocontagiosas de etiologia variada.

2. METODOLOGIA

A realização deste trabalho foi consolidada por meio de uma revisão bibliográfica em formato narrativo, que de acordo com Cordeiro (2007) é a que possui temática aberta, não exigindo protocolo rígido para sua confecção e busca de fontes não é específica e nem pré-determinada.

Foram utilizadas as bases de dados NCBI, SciELO, PubMed e Google Acadêmico para levantar artigos publicados no período de 2000 a 2018. Para isso foram utilizadas as palavras-chave: diagnóstico molecular, biologia molecular, reação em cadeia da polimerase, HIV, influenza, cândida, toxoplasmose, tuberculose, tanto no idioma português quanto inglês. Excepcionalmente artigos em espanhol foram utilizados quando pertinentes ao assunto e também artigos ou documentos fora do período pré-estipulado em função de sua relevância para o tema.

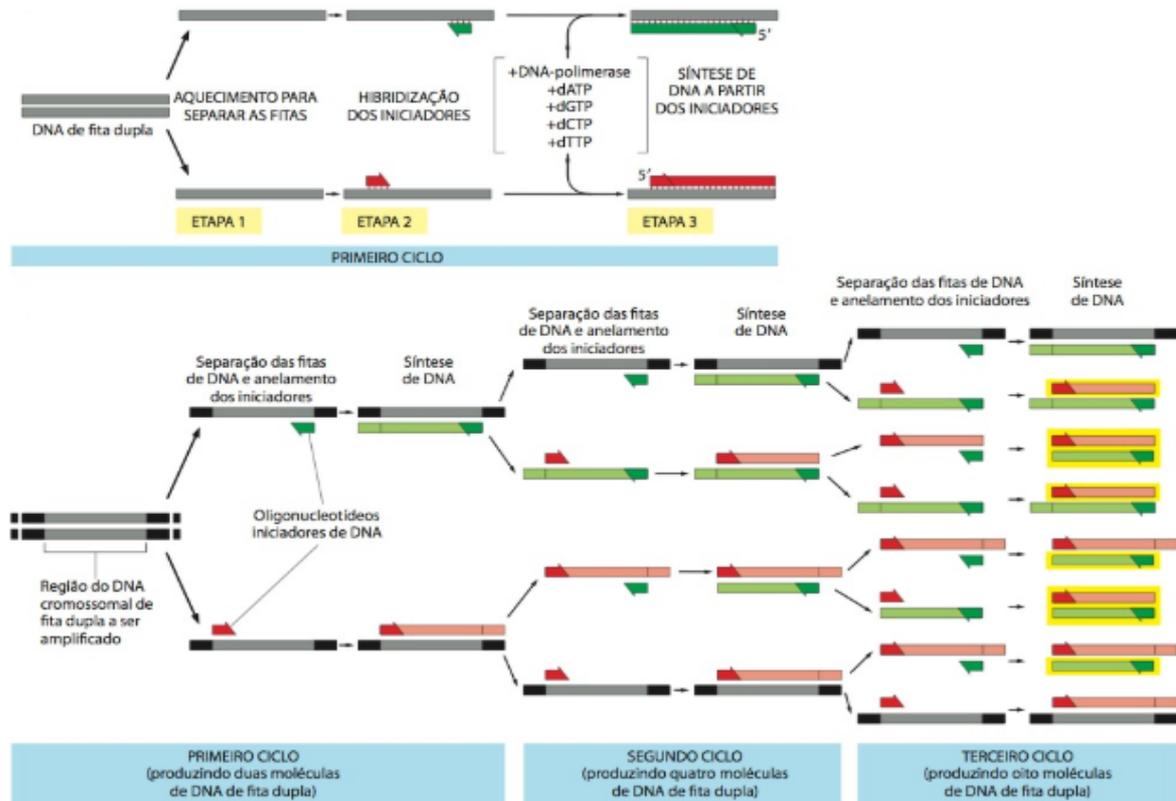
3. DESENVOLVIMENTO

3.1 PCR e suas variações

Indubitavelmente o avanço que mais impulsionou o uso do DNA como analito na prática clínica foi o advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) descrita na década de 80 e que caracteriza-se pela amplificação enzimática *in vitro* de curtas regiões de DNA. Oligonucleotídeos (*primers*) iniciadores, ou seja, curtos filamentos de DNA são utilizados para reconhecer e hibridar com as sequências-alvo presentes no ácido nucleico da amostra que são, posteriormente, amplificadas pela enzima *Taq* DNA polimerase. Essa é uma enzima termoestável que, em presença do íon magnésio como cofator, e do tampão que mantém o pH estável, e de desoxinucleotídeos livres, os dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfato) sintetiza DNA a partir de uma cadeia de DNA que funcione como molde para a síntese. A enzima *Taq* DNA polimerase, isolada da bactéria *Thermus aquaticus* se mantém estável após exposições a altas temperaturas, possuindo atualmente variações em sua molécula base que lhe confere características especiais (MULLIS, 1990; ROSELINO, 2008; VALONES et al., 2009).

Após ciclos de aumento e queda da temperatura, realizados pelo termociclador multiplica-se de maneira exponencial a quantidade de moléculas de DNA na reação, o que ocorre a partir da desnaturação (separação) das fitas duplas de DNA com posterior anelamento dos iniciadores e ação da enzima DNA polimerase, que estende, utilizando os desoxinucleotídeos livres. Ao final de um ciclo térmico, a quantidade de moléculas sintetizadas aumenta em escala exponencial. Cada nova molécula de DNA produzida atua como um novo alvo para o próximo ciclo; sendo assim há a criação de milhares de cópias de DNA-alvo, com alta velocidade, como pode ser ilustrado pela figura 1. Ao final da reação de PCR há visualização por eletroforese em gel de agarose, determinando-se o tamanho do fragmento do produto de PCR obtido quando comparado a marcadores de massa molecular de tamanhos conhecidos (XAVIER et al., 2009).

Figura 1: Representação esquemática da PCR.

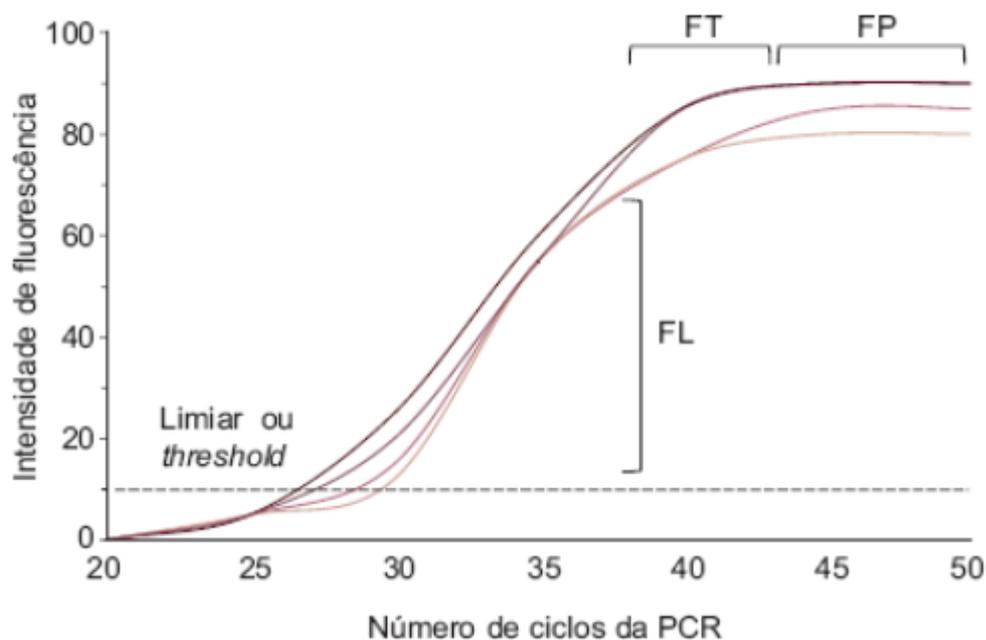


Fonte: Adaptado de Alberts et al. (2017).

Já a PCR em tempo real, também chamada de PCR quantitativa (qPCR) descrita em 1993 por Higuchi e seus colaboradores permite a detecção do aumento da fluorescência durante a reação, devido à ligação de sondas fluorescentes às moléculas de DNA de dupla cadeia recém-sintetizadas. O procedimento é semelhante a PCR convencional acrescentando-se a possibilidade de quantificar em tempo real o DNA amplificado em cada ciclo, eliminando a necessidade do preparo do gel de agarose para eletroforese. As fases de amplificação, detecção e quantificação ocorrem simultaneamente de forma que a medida que vai ocorrendo a amplificação, a sonda (denominada TaqMan) vai sendo degradada e há a liberação de um fluorocromo que absorve e emite energia em um comprimento de onda específico. 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 que pode ser observado na figura 2. Portanto, além do termociclador com sistema óptico para a excitação e recolhimento da emissão da fluorescência, é necessário ainda um computador com *software* adequado para a aquisição e análise dos dados finais da reação. Essa técnica, já é utilizada no acompanhamento de diversas doenças como AIDS, hepatite

C e B, toxoplasmose e leishmanioses (HIGUCHI et al., 1993; CAVALCANTI et al., 2008; NASCIMENTO, 2010; OLIVEIRA et al., 2010).

Figura 2: Curva sigmoide de amplificação da PCR em tempo real, no gráfico de intensidade de fluorescência *versus* número de ciclos. O ensaio consiste em uma progressão exponencial que pode ser monitorada. Ao possuir quantidade satisfatória de produto amplificado, as taxas de amplificação entram em fase linear (FL). À medida que os reagentes são utilizados entra na fase de transição (FT) e, então, alcança a estabilidade ou fase de *plateau* (FP), na qual ocorre pouca ou nenhuma emissão de fluorescência. O ponto em que a fluorescência ultrapassa o limiar do sinal de fundo é chamado de limiar do ciclo ou threshold (linha pontilhada), e esse valor é usado para calcular a quantidade de produto a ser utilizado na reação.



Fonte: Adaptado de Santos et al (2015).

A PCR Multiplex por sua vez, utiliza mais de um par de iniciadores na mesma reação, logo, mais de um segmento genômico é amplificado numa única reação, cada um com seu par de iniciadores específicos, o que aumenta a sensibilidade do ensaio (POROCA, 2009). Cabe aqui ressaltar dois aspectos clínicos de extrema relevância: especificidade e sensibilidade. Sensibilidade é a capacidade que um teste para diagnóstico ou triagem tem de detectar os verdadeiramente positivos, ou seja, os indivíduos seguramente doentes, já a especificidade é a capacidade de detecção dos verdadeiramente negativos, isto é, de determinar precisamente os indivíduos saudáveis (ABBAS, 2013). A capacidade de analisar simultaneamente várias sequências-alvo num único tubo permite maximizar a utilização de amostras preciosas tais como líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como reduzir o uso de reagentes e de etapas de pipetagem e, portanto, diminuindo erros. Atualmente tem sido utilizada, com sucesso, na detecção de infecções sexualmente transmissíveis concomitantes a infecção pelo HIV e também na detecção simultânea de arboviroses de

interesse para a saúde pública como Dengue, Zika e Chikungunya (ROCHE, 2015; CAMPOS et al, 2015; MELLO, 2017).

Já quando se necessita utilizar a PCR para detectar um agente viral, é importante lembrar que os genomas de vários vírus de relevância clínica são compostos de RNA e não de DNA, nesse caso, é preciso a realização da transcrição reversa antes de se iniciar a amplificação por PCR, utilizando para tal a enzima transcriptase reversa, a qual é capaz de sintetizar, a partir de uma amostra de RNA, um DNA complementar (cDNA) que servirá de alvo para a PCR convencional. A técnica é conhecida como RT-PCR ou *reverse transcriptase-PCR* (CAVALCANTI et al., 2008).

Outra tecnologia é a Nested-PCR que utiliza dois pares de iniciadores promovendo uma reamplificação que aumenta a sensibilidade e a especificidade da técnica sendo utilizada com eficiência para a detecção do vírus causador da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), e de microrganismos presentes em baixa quantidade no sangue como *Rickettsia* e *Bartonella* (TAO et al., 2004; KONEMAN et al., 2014).

Levando-se em consideração o contexto apresentado, o *Food and Drug Administration* (FDA), agência do governo Norte Americano responsável pela averiguação de produtos alimentares e médicos, aprovou a utilização da PCR para a detecção de patógenos como a *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, Citomegalovírus (CMV), HIV, HPV, entre vários outros conforme pode ser observado no quadro abaixo (Quadro 1). Para a infectologia, a detecção rápida de microrganismos não cultiváveis ou de lento crescimento é possibilitada pela biologia molecular além de ser utilizada no monitoramento de doenças através da quantificação do agente infeccioso ou na determinação de resistência, melhorar o diagnóstico, prognóstico e indicação da terapia (YANG; ROTHMAN, 2004; MELHEM et al., 2010).

Quadro 1: Comparação entre as metodologias de PCR mais utilizadas na prática clínica.

Exemplos de variações da técnica de PCR				
Nome	Método	Exemplos de utilização	Vantagem	Desvantagem
PCR Multiplex	Utiliza dois ou mais pares de primers na mesma reação que se anelam em regiões distintas do gene.	Detectar concomitantemente e arboviroses diferentes como Zika, Dengue e Chikungunya (MELLO, 2017).	Possibilita a detecção simultânea de múltiplos alvos	Os iniciadores precisam ser altamente específicos e os diversos pares de iniciadores precisam ser otimizados para funcionar nas mesmas condições
PCR Nested	Promove reamplificação do produto de PCR, aumentando a especificidade	Identificar corretamente qual espécie de Cândida gera a candidemia em questão (NEGRO, 2009)	Aumenta sensibilidade e especificidade	Aumenta o risco de contaminação durante a manipulação do produto da primeira reação
Real Time PCR	Visualização imediata da amplificação. Quantitativo.	Identificar os principais agentes etiológicos das meningites bacterianas de forma rápida (AZEVEDO, 2017)	Possibilita a quantificação do alvo, reduz risco de contaminação, pois não há necessidade de manipulação do produto amplificado	Custo mais elevado em relação a PCR convencional
RT-PCR	Amplifica DNA por meio da transcrição reversa do RNA	Detectar agentes etiológicos causadores de septicemia (CORLESS, 2001).	Possibilita a detecção de alvos de RNA	Menor sensibilidade se comparada a Q-PCR, pois depende do sucesso da transcrição reversa.

Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 Diagnóstico de Doenças Virais

As técnicas de biologia molecular tornaram-se vitais para detectar doenças virais, monitorar a carga viral, acompanhar a terapia antiviral e genotipar variadas espécies. Uma das vantagens que pode ser destacada é que as técnicas para a identificação viral feitas a partir de biologia molecular não dependem da ligação antígeno-anticorpo diferentemente das imunológicas. Entretanto, deve-se ter atenção ao interpretar os resultados dessas técnicas, visto que, por vezes, detectar apenas o genoma viral não é suficiente para determinar uma infecção recente, já que o vírus pode estar ocasionando uma infecção persistente produtiva assintomática e não ser ele o agente causador da doença em questão, portanto a técnica molecular não exclui a sorologia (SANTOS et al., 2015).

As metodologias moleculares apresentam como vantagem também, viabilizar aos laboratórios maior rapidez para reconhecer um patógeno de cultivo trabalhoso ou que se apresenta em reduzida quantidade na amostra clínica, além da capacidade molecular de reduzir o tempo de detecção do agente ao evitar a janela imunológica, tempo em que os testes sorológicos não têm sensibilidade para detectar a soroconversão do paciente. Por exemplo, o HIV possui uma janela imunológica longa, na qual fica indetectável pela sorologia. O RT-PCR é capaz de diminuir a detecção do vírus de 22 dias pós-infecção (resultado obtido com teste imunoenzimático moderno) para apenas 11 dias (SANTOS et al., 2015).

3.2.1 HIV (Human Immunodeficiency Virus - Vírus da Imunodeficiência Humana)

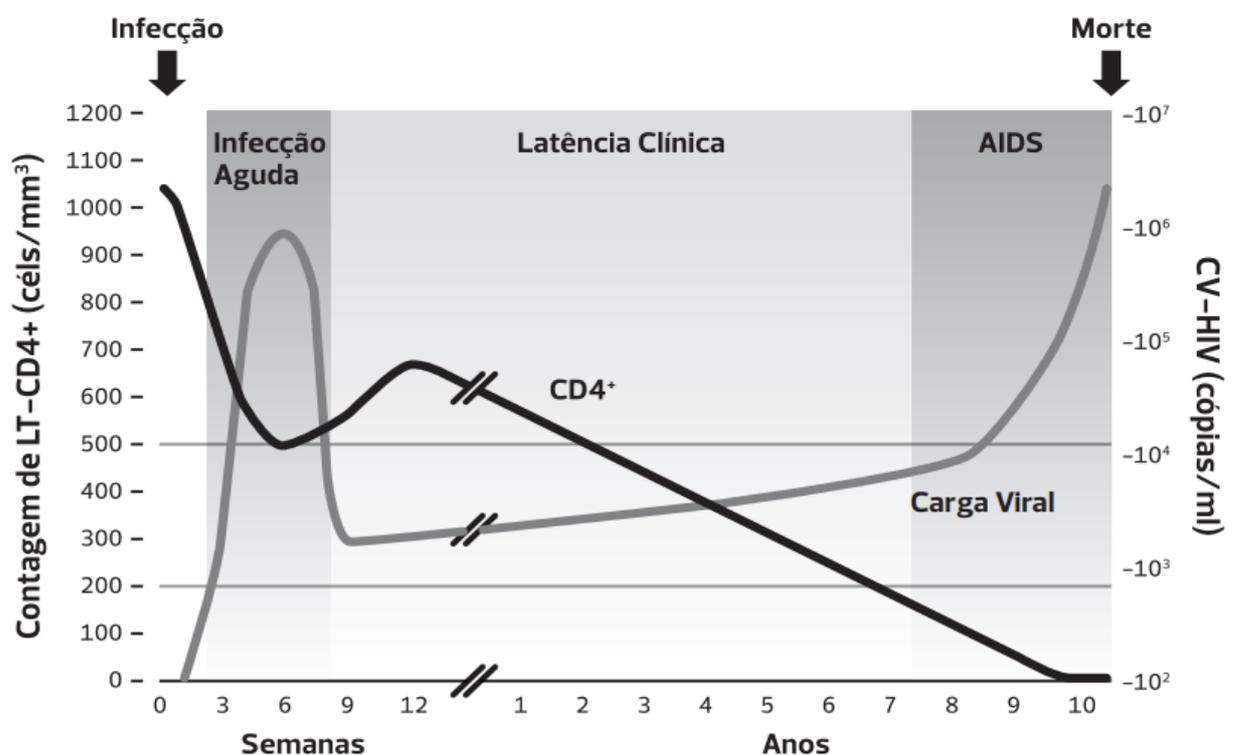
De 2007 até junho de 2017, foram notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 194.217 casos de infecção pelo HIV no Brasil segundo o Ministério da Saúde (MS). De 1980 a junho de 2017, foram identificados no país 882.810 casos de AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida). O país tem registrado, anualmente, uma média de 40 mil novos casos de AIDS nos últimos cinco anos. Dois vírus são mais intimamente relacionados a AIDS sendo eles o HIV-1 e HIV-2, sendo epidemiologicamente, o HIV-1 mais relevante (BRASIL a, 2017).

O HIV-1 é um retrovírus (classe VI Baltimore) de simetria complexa e com envelope presente, cuja informação gênica está contida em duas fitas simples de RNA, que sofrem transcrição reversa para se integrar ao DNA do hospedeiro e se replicar. A infecção pelo HIV é persistente, com prazos de evolução para AIDS variáveis como pode ser visto na figura 3. Os testes de biologia molecular são extremamente importantes, principalmente para o diagnóstico em situações de transmissão vertical e na triagem em serviços de

hemoterapia. Sua importância é secundária para indicar o tratamento, porém é o exame de maior aplicabilidade e relevância para monitorar a terapia, visto que a quantificação de carga viral, que é o valor indicativo de sucesso da medicação, pode ser feita por PCR em tempo real (considera-se que o indivíduo indetectável possui uma taxa menor que 40 cópias/ml) (BRASIL, 2017b).

Em casos de infecção recente, a detecção do DNA pró-viral no creme leucocitário (*Buffy coat*) é essencial, visto que há uma janela imunológica de até 4 semanas. Nos casos de transmissão materno-fetal, o diagnóstico sorológico é insuficiente devido à transmissão de anticorpos na gestação de maneira passiva e, nestes casos, a qPCR é utilizada para confirmar o diagnóstico. O teste de resistência genotípica aos antirretrovirais, conhecido como genotipagem do HIV-1, pesquisa a presença de mutações no gene *pol* do HIV-1, que levam à resistência aos medicamentos utilizados no tratamento da infecção pelo HIV-1, como os inibidores nucleosídeos e não nucleosídeos da transcriptase reversa e os inibidores da protease (OKAY; GRANATO, 2000; KURITZKES et al., 2003; MACEDO et al., 2011).

Figura 3: Gráfico tempo *versus* contagem de linfócitos TCD4+, as principais células que o vírus infecta, mostrando o curso da infecção pelo HIV, que pode ser dividida em quatro fases clínicas, sendo a primeira de infecção aguda, a segunda de fase assintomática, também conhecida como latência clínica e a terceira de fase sintomática inicial ou precoce até efetivamente a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.



Fonte: BRASIL, 2017b.

Como o vírus infecta o sistema imune, há propensão ao desenvolvimento de outras doenças de forma concomitante, em especial de outras IST's (Infecções Sexualmente Transmissíveis), que podem ser detectadas por PCR MULTIPLEX (TERRA, 2000; BRASIL, 2006; CAMPOS et al, 2015).

3.2.2 Influenza

A ampliação global de doenças infecciosas que geram morbidade e mortalidade na população, deve-se principalmente aos vírus, em destaque o vírus Influenza A. A capacidade de diversificar seu genoma leva ao surgimento de epidemias e pandemias. Ao longo da história várias pandemias foram provocadas pelo vírus Influenza A como, por exemplo, “Gripe Espanhola” (H1N1) de 1918; “Gripe de Hong Kong” (H3N2) em 1968; a “Gripe das Aves” (H5N1) em 1997 e a “Gripe Suína” (H1N1) em 2009 (DANTAS, 2017).

O vírus *Influenza* pertence à família Orthomyxoviridae, composta pelos gêneros: *Influenza A*, *Influenza B* e *Influenza C*. Os tipos A e B são os causadores das epidemias respiratórias que ocorrem geralmente no inverno (sazonais) e estão associados ao aumento da hospitalização e da mortalidade. O tipo C, não têm grande relevância para a saúde pública, visto que não é capaz de gerar epidemias como os tipos A e B, podendo inclusive ser assintomático ou apenas produzir sintomas leves. O *Influenza A* é um vírus de RNA fita simples (classe V Baltimore) que sofre variadas mutações em seu genoma e assim divide-se em subtipos caracterizados pelas diferenças nas duas glicoproteínas constituintes do envelope lipídico do vírus, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). Os subtipos mais frequentes de tipo A são o A (H1N1) e o A (H3N2). A transmissão ocorre de forma direta, por meio da inalação de aerossóis (gotículas respiratórias). Os principais sintomas apresentados são tosse e cansaço, febre alta, dor muscular e cefaleia. Os inibidores da neuraminidase são as drogas recomendadas para o tratamento (oseltamivir e zanamivir). No entanto, a ocorrência de resistência a este grupo de medicamentos já tem sido relatada. Pessoas de todas as faixas etárias estão sujeitas a infecção por estes vírus mas, uma atenção maior deve ser dada às crianças, mulheres grávidas, idosos e indivíduos que apresentam comorbidades (cardiopatas, asmáticos, hipertensos, diabéticos, dentre outras) pois, estes possuem maiores chances de desenvolver complicações devido à influenza, responsável por aproximadamente meio milhão de óbitos globais por ano (SUAREZ et al., 2007; WHO, 2011; CARLI et al., 2012; BEIRIGO et al., 2017; DANTAS, 2017; MARCOS et al, 2017).

Atualmente, o diagnóstico se baseia na clínica do paciente associado a testes sorológicos que buscam antígenos virais, porém tais métodos podem gerar muitos erros,

visto que os patógenos causadores de infecções no sistema respiratório geram sintomatologia muito semelhante, além da importância para a saúde pública do diagnóstico laboratorial do vírus como fator para contenção, prevenção, vigilância epidemiológica e correta instrução terapêutica ao paciente, métodos mais sensíveis, como os moleculares, podem ser mais comumente adotados. Além disso, o diagnóstico oportuno da infecção por influenza pode ajudar a reduzir o uso de antibióticos durante as estações da gripe e, conseqüentemente, a pressão de seleção de antibióticos (MELLO, 2010; ANVISA, 2013; AKERS et al., 2017).

Para identificar os vírus abordagens que incluem a cultura viral, a detecção de antígenos do vírus, como os testes de imunofluorescência e os métodos de detecção do ácido nucleico são os mais utilizados. A detecção de anticorpos é realizada geralmente para determinar o nível imunológico e avaliar, por exemplo, o sucesso da estratégia de vacinação pois, cada um apresenta características próprias. O tempo que cada metodologia necessita para produzir o resultado deve ser levado em consideração, e pode ser avaliado no quadro 2, neste quadro também estão descritas as amostras clínicas que podem ser utilizadas (AKERS et al., 2017; CDC, 2018).

Quadro 2: Comparação entre metodologias para diagnóstico da Influenza.

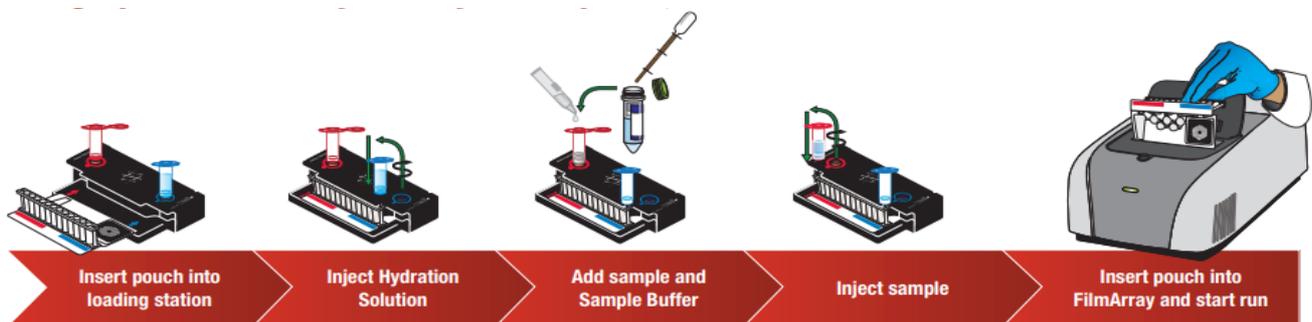
Método	Tipos Detectados	Espécimes Aceitáveis	Tempo de Teste
Testes Rápidos de Diagnóstico da Influenza (detecção de antígenos)	A e B	Swab Nasofaríngeo: aspirado ou lavado; swab nasal: aspirado ou lavado; swab garganta	<15 min.
Ensaio Molecular Rápido (detecção de RNA viral de influenza ou de ácido nucleico)	A e B	Swab nasofaríngeo; swab nasal	15-30 min.
Imunofluorescência, Direta (DFA) ou Indireta (IFA) de Anticorpo Fluorescente (detecção antigênica)	A e B	Swab ou lavado nasofaríngeo, lavado brônquico, aspirado endotraqueal ou nasal	1-4 horas
RT-PCR (singleplex e multiplex; em tempo real e outro baseado em RNA) e outros ensaios moleculares (detecção de RNA de influenza ou ácido nucleico)	A e B	Swab nasofaríngeo ou de garganta, lavado brônquico ou nasofaríngeo, aspirado nasal ou endotraqueal, escarro	Varia (1 a 8 horas, varia de acordo com o ensaio)
Cultura celular rápida (frascos de concha; misturas de células; produção de vírus vivos)	A e B	Swab nasofaríngeo ou de garganta, lavado brônquico ou nasofaríngeo, aspirado nasal ou endotraqueal, escarro	1-3 dias
Cultura de células do tecido viral (convencional; produz vírus vivos)	A e B	Swab nasofaríngeo ou de garganta, lavado brônquico ou nasofaríngeo, aspirado nasal ou endotraqueal, escarro	3-10 dias

Fonte: Adaptado de CDC (2018).

Um dos métodos mais modernos e completos disponíveis e já utilizados para detecção de doenças respiratórias, inclusive o Influenza, é o *FilmArray® Respiratory Panel*, comercialmente chamado de *BioFire*, produzido pelo laboratório *BIOMERIEUX* que testa um conjunto de 20 patógenos virais e bacterianos mais comuns que causam infecções do trato respiratório. O resultado é gerado em cerca de 1 hora e a lista de detecção de patógenos

pode ser visualizada na tabela 1. O procedimento funciona a partir de uma bolsa que armazena todos os reagentes necessários para a preparação de amostras, transcrição reversa, PCR e detecção em um formato liofilizado. Antes de uma corrida, o usuário injeta a solução de hidratação e a amostra é combinada com a mistura do tampão presente na bolsa. O instrumento FilmArray então extrai e purifica todos os ácidos nucleicos da amostra e, em seguida, executa um PCR multiplex, como pode ser visualizado na figura 4. Durante a PCR, o FilmArray realiza uma única reação de multiplexação maciça de grande volume e, por último, um *singleplex* individual detecta os produtos da PCR de primeiro estágio. Usando dados da curva, o software FilmArray gera automaticamente um resultado para cada alvo em um único relatório (BIOFIRE DIAGNOSTICS, 2018).

Figura 4: Representação esquemática do funcionamento do *BioFire*



Fonte: Adaptado de BIOFIRE DIAGNOSTICS, 2018.

Tabela 2: Lista dos principais patógenos detectados pelo sistema *BioFire* mostrando as respectivas porcentagens de sensibilidade e especificidade que são apresentadas pela reação de PCR Multiplex.

Patógeno	Sensibilidade	Especificidade
Adenovírus	100%	98,3%
Coronavírus HKU1	95,8%	99,8%
Coronavírus NL63	95,8%	100%
Rinovírus Humano	95,7%	94,6%
Influenza A	90%	99,8%
Influenza A/H1	100%	100%
Influenza A/H3	100%	100%
Influenza A/H1-2009	100%	99,6%
Influenza B	100%	100%
Parainfluenza 1	97,1%	99,9%
Vírus Respiratório Sincial	100%	89,1%
<i>Bordetella pertussis</i>	100%	99,90%
<i>Mycoplasma</i>	100%	100%

pneumoniae

Fonte: Adaptado de BIOFIRE DIAGNOSTICS, 2018.

3.3 Diagnóstico de Doenças Fúngicas

Os fungos são responsáveis por uma grande variedade de patologias e tradicionalmente são divididos em leveduras e fungos filamentosos. Os métodos convencionais para identificação fúngica se baseiam na sintomatologia da doença, isolamento e cultura, reconhecimento por morfologia e testes bioquímicos. Embora estes métodos sejam ainda de extrema importância, há um movimento crescente para adesão aos diagnósticos moleculares. É válido ressaltar que a cultura é o padrão ouro no diagnóstico, porém, o correto isolamento e identificação de um fungo, tanto em cultura como em análise histopatológica estão sujeitos a diversos fatores como a necessidade de profissionais experientes, do tempo de crescimento em cultura do agente etiológico, além de não serem quantitativos e propensos a contaminação e erros, protelando o tratamento. Portanto, técnicas moleculares mais sensíveis para diagnosticar infecções fúngicas são de extrema relevância, principalmente no ambiente hospitalar. A PCR é considerada uma das melhores técnicas junto com a hibridação *in situ*, visto que podem ser feitas em sangue periférico, diversos fluidos corporais, incluindo os obtidos por punção e tecidos *in natura* ou fixados. O teste de PCR em tempo real ainda possui a vantagem de diminuir o tempo de resposta em comparação com o teste de PCR convencional, pois elimina a necessidade de realizar o processamento e a detecção pós-amplificação, o que reduz a possibilidade de contaminação ambiental com ácidos nucleicos amplificados, o que é particularmente importante para diagnósticos fúngicos devido à presença onipresente de fungos ambientais (WENGENACK et al., 2009; MELHEM et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2016).

3.3.1 Candidemias

As IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde) são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade no ambiente hospitalar, neste contexto, destacam-se as fungemias, que se estabelecem quando há comprometimento da resposta imunológica do hospedeiro. Ao longo do tempo, a ciência médica melhorou significativamente a sobrevivência de pacientes críticos, o que levou a um aumento de infecções em UTI (Unidade de Terapia Intensiva). O diagnóstico utilizado atualmente para este tipo de infecção é a hemocultura, lenta e de baixa sensibilidade. O diagnóstico rápido promovido pelas técnicas moleculares é essencial para escolha da terapia antimicrobiana adequada e a diminuição do tempo de internação, evitando gastos e sobrecarga ao sistema de saúde. As infecções causadas por fungos são consideradas a quarta causa de sepse em UTI, sendo a infecção pelo gênero *Candida* a mais frequente, responsável por 90 a 95% das infecções

fúngicas registradas nesse ambiente. A candidemia é assim, uma micose oportunista caracterizada pela presença do fungo no sangue, ocasionada por leveduras do gênero *Candida*, sendo a espécie *Candida albicans* a mais prevalente, entretanto, outras espécies podem colonizar o indivíduo e o diagnóstico convencional pode não ser conclusivo, o que gera uma grande alteração sobre a seleção da terapia antifúngica empírica, já que as espécies mostram comportamentos individuais divergentes em relação aos fármacos utilizados como terapia (ATKINS; CLARK, 2004; SIQUEIRA, 2012; RUIZ; PEREIRA, 2016).

Diante do que foi dito, o desenvolvimento de métodos rápidos e sensíveis para a detecção de candidemia tem sido uma área de interesse significativo nos últimos anos, como pode ser visualizado na tabela 3. Dunyach e seus colaboradores (2008) desenvolveram um método de PCR em tempo real para a detecção de cinco espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) em amostras clínicas de soro. Dois conjuntos de iniciadores separados foram avaliados; o primeiro conjunto (espaçador interno transcrito - ITS) teve como alvo uma região conservada do DNAr 18S e 28S, e o segundo conjunto (L18) teve como alvo uma região variável dentro do DNAr 18S. O estudo analisou 58 soros de 23 pacientes que tinham infecção da corrente sanguínea fúngica comprovada ou provável. O ensaio de PCR em tempo real detectou o ácido nucleico de *Candida* em 12 de 13 (92%) pacientes que tinham infecção comprovada, enquanto o ensaio de PCR do ITS foi positivo em 10 de 13 (76,9%) pacientes. Notavelmente, o ensaio de PCR em tempo real para a detecção da região ITS permitiu a diferenciação das cinco espécies de *Candida* baseados em análises de curva de fusão. A discriminação precisa das espécies de *Candida* por meio dos ensaios de PCR em tempo real pode ajudar os médicos a selecionar o regime antifúngico mais adequado em tempo hábil. Metwally e colaboradores (2007) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real para a diferenciação de espécies nas quais a resistência ao fluconazol é uma preocupação (por exemplo, *C. krusei* e *C. glabrata*) de espécies sensíveis ao fluconazol (por exemplo, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) diretamente de frascos de cultura de sangue positivo. O método de PCR foi validado com o uso de hemocultura que eram positivas ou negativas para levedura e demonstraram 100% de concordância com os achados da identificação fenotípica convencional. Além disso, o ensaio de PCR permitiu a identificação de *C. glabrata* e *C. krusei* em menos de 3 horas, comparado com as aproximadamente 72 horas requeridas usando técnicas fenotípicas de rotina (METWALLY et al., 2007; DUNYACH et al., 2008; WENGENACK et al., 2009)

Tabela 3: Principais métodos moleculares que podem ser utilizados na detecção das várias espécies de *Candida*.

Ensaio de PCR em tempo real para a detecção e identificação de <i>Candida</i>						
Tipo de amostra	Tecnologia	Alvo da análise	Método convencional	Sensibilidade	Especificidade	Comentário
Sangue	<i>ABI 5700 TaqMan</i>	<i>5.8S/28S rDNA</i>	Cultura	100%	97%	Quantitativo
Sangue	<i>LightCycler FRET HP</i>	<i>ITS2</i>	Cultura	100%	100%	Detecta e diferencia seis espécies com quatro conjuntos de sonda
Sangue	<i>LightCycler SYBR</i>	<i>18S rRNA</i>	Cultura	Não relatado	Não relatado	Detecta sete espécies
Soro	<i>LightCycler SYBR</i>	<i>mp65</i>	Cultura, Histopatológico	Não relatado	Não relatado	Quantitativo
Sangue	<i>ABI 7700 TaqMan</i>	<i>18S rRNA, ITS</i>	Cultura	100%	100%	Diferencia espécies sensíveis e resistentes
Sangue	<i>RotorGene 3000 TaqMan</i>	<i>rpr1</i>	Cultura	Não relatado	Não relatado	Detecta oito espécies
Soro	<i>LightCycler SYBR</i>	<i>18S/28S rDNA</i>	Cultura	92%	100%	Detecta cinco espécies

Fonte: Adaptado de Wengenack et al (2009).

3.4 Diagnóstico de Doenças Parasitárias

A parasitologia foi a última área da infectologia a incorporar a biologia molecular devido aos custos elevados dos ensaios e às baixas prevalências dessas infecções em países desenvolvidos, que são responsáveis pelo avanço científico tecnológico global. A PCR em tempo real tem sido utilizada comumente na detecção do *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da malária, e do *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de Chagas, especialmente em serviços de hemoterapia. Outros parasitas também já possuem ensaios padronizados como, por exemplo, *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Trichomonas*, e *Giardia spp*, como pode ser visualizado na tabela 4 (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2010, MARQUES, 2016).

3.4.1 Toxoplasmose

Toxoplasma gondii é um protozoário intracelular obrigatório, de distribuição ubíqua e que acomete com muita frequência a população humana (estima-se que em geral 1/3 das pessoas seriam sorologicamente positivas), sob a forma de infecção crônica assintomática. A infecção é grave em imunocomprometidos, grávidas e indivíduos com acometimento ocular. A infecção em imunocompetentes é sintomática em apenas 10% dos casos cursando com sintomas como linfonodomegalia autolimitada, febre, urticária, hepatoesplenomegalia, erupção maculopapular e coriorretinite. A sorologia é o método mais utilizado no diagnóstico, no entanto, não existem exames que de forma única, corroborem ou excluam o diagnóstico de infecção recente ou tardia; portanto é necessário que se teste todos os marcadores (IgG, e IgM) (REY, 2008; HERMES PARDINI, 2016).

A PCR em Tempo Real é indicada quando se necessita de um diagnóstico rápido no paciente imunodeprimido e na presença de acometimento do sistema nervoso central (SNC), para detectar a presença de acometimento ocular e, estabelecer o diagnóstico de Toxoplasmose congênita pré e pós-natal, confirmando a infecção fetal, quando pesquisada em líquido amniótico, coletado após 18 semanas de gestação, mas também pode ser utilizado sangue do cordão umbilical do feto, em líquido cefalorraquidiano, material de biópsia cerebral, entre outros. A PCR apresenta sensibilidade de 64%, com especificidade de 100%. A presença do protozoário pode ser constatada por meio de seus componentes antigênicos ou de frações de ácido nucleico. Diferentes pares de iniciadores são utilizados, o que pode ser visualizado nas tabelas 4 e 5. Um dos primeiros a serem utilizados foi o gene *P30*, codificante do principal antígeno de superfície de *T. gondii* (SAG1). Porém, o mais utilizado atualmente é o gene *B1* que se encontra repetido em 35 cópias no genoma de *T. gondii*. Esse gene *B1* foi descrito por Boothroyd e colaboradores (1987) e demonstrou alta

sensibilidade, possuindo a capacidade de detectar até 1 parasito em aproximadamente 100 mil células hospedeiras. Por ser uma região conservada no genoma do parasita, o gene *B1*, é muito específico. A detecção do gene *B1* por PCR em sangue periférico, líquido e urina deve ser pensada em todo neonato com suspeita da doença (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005; REY, 2008; CARNEIRO, 2011; HERMES PARDINI, 2016).

Tabela 4: Principais métodos moleculares que podem ser utilizados na detecção das várias espécies de parasitas.

Ensaio de PCR para a detecção e identificação parasitaria						
Agente etiológico	Tecnologia	Alvo da análise	Método convencional	Sensibilidade	Especificidade	Comentário
<i>Plasmodium sp.</i>	Nested-PCR	<i>ssurRNA</i> (Gene que codifica a menor subunidade do RNA ribossomal do <i>Plasmodium</i>)	Gota espessa	96,7%	62,2%	A maior sensibilidade e da PCR garante a detecção de baixas parasitemias (COSTA et al., 2008).
<i>Trypanosoma cruzi</i>	PCR e qPCR	<i>TcZ1/2</i> , <i>TcZ3/4</i> ; <i>TC1/2</i> e <i>Cruzi1/2</i> . (Amplificam regiões de microssatélite, com repetições <i>in tandem</i>)	Sorologia	60%	100%	Por meio da PCR é possível a identificar o parasito em fluido biológico e a estimar a carga parasitária se realizada a qPCR (MARQUES, 2016).
<i>Toxoplasma gondii</i>	PCR e qPCR	<i>Gene P30</i> (Codifica o principal antígeno de superfície de <i>T. gondii</i> -SAG1). <i>Gene B1</i> (Se encontra repetido em 35 cópias no genoma do	Sorologia	64%	100%	A qPCR que utiliza o gene B1 como alvo possui capacidade de detectar até 1 parasito em aproximadamente 100 mil células

		parasito).				hospedeiras (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).
<i>Leishmania</i>	PCR, qPCR e PCR-RFLP	Região conservada do mini círculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) que amplifica um fragmento de 120 pb.	Sorologia	97,2%	Não relatado	A RT-Q PCR mostrou ser uma metodologia promissora para estudos de quantificação da carga de DNA de <i>Leishmania</i> (QUARESM A, 2007).
<i>Trichomonas vaginalis</i>	PCR	<i>BTUB2/BTU B9</i> (gene da região betatubulina que codifica um fragmento de 112pb)	Exame direto do fluido vaginal em microscopia	81%	Não relatado	A PCR para o diagnóstico do <i>T. vaginalis</i> tem se mostrado bastante sensível, excedendo todos os outros (VAN DER POL et al., 2006).

Fonte: Elaborado pela autora.

3.5 Diagnóstico de Doenças Bacterianas

3.5.1 *Mycobacterium tuberculosis*

A tuberculose (TB) é uma das doenças infecciosas de maior impacto na saúde pública mundial pela sua alta letalidade. Estima-se que um quarto da população mundial está infectada com tuberculose. Apenas em 2016, 10,4 milhões de pessoas em todo o mundo adoeceram com tuberculose e 1,7 milhões vieram a óbito devido à doença. O Brasil situa-se entre os 22 países considerados prioritários para controle da tuberculose pela OMS (2017), por concentrarem 80% dos casos da doença em todo o mundo. No Brasil, a cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil casos novos e ocorrem cerca de 4,5 mil mortes em decorrência da TB. O sucesso no controle da tuberculose deve adotar ações voltadas ao diagnóstico precoce dos sintomas respiratórios, tema já abordado neste trabalho, seu correto tratamento e ampliação acerca do conhecimento popular da doença. Deve-se ainda frisar a importância de orientar corretamente o paciente em relação a terapêutica, uma vez que, o abandono do tratamento além de elevar consideravelmente o risco de óbito, mantém o paciente infectante e contribui para o isolamento de *M. tuberculosis* resistentes aos antimicrobianos de primeira escolha. Um dado epidemiológico relevante é a elevada frequência em que se detecta a coinfeção HIV-tuberculose. A chance de desenvolver a doença é muito maior entre indivíduos soropositivos e tal agravo cursa como a principal causa de óbito por infecção entre os pacientes de AIDS no Brasil, e a segunda no mundo (SEGURADO et al., 2016; CDC, 2017; BRASIL, 2017c).

A infecção pode ser aguda ou crônica e, frequentemente, manifesta-se no trato respiratório inferior apresentando mal-estar, febre, sudorese noturna, perda de peso e tosse produtiva. Em estágios avançados pode haver ainda dispneia, dor torácica e hemoptise. A TB pode ser gerada por qualquer espécie pertencente ao complexo *Mycobacterium tuberculosis*, no entanto é mais relatada associada a *M. tuberculosis*, um bacilo álcool-ácido

resistente, Gram-positivo e de crescimento lento que foi relatado em 1882 por Robert Koch (MACENTE; RIBEIRO, 2009; BURTON, 2012).

O diagnóstico ainda é realizado por meio da baciloscopia e cultura em meio Lowenstein-Jensen, seguido de provas bioquímicas para a identificação da espécie. A microscopia após coloração de Ziehl-Neelsen, em busca de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em escarro, é um método rápido e de baixo custo. No entanto, possui sensibilidade e especificidade muito baixa, já que são necessários pelo menos 5.000 bacilos para positivar o teste, apresentando assim sensibilidade de apenas 65%. O padrão ouro de diagnóstico se dá pela cultura, que requer mais de três semanas para um diagnóstico definitivo, além de não determinar qual é a espécie causadora da doença. Os pacientes infectados apresentam teste cutâneo positivo de hipersensibilidade tardia (realizado com o derivado proteico purificado (PPD) do bacilo) e os tubérculos pulmonares podem ser visualizados em Raio-X de tórax. O teste cutâneo positivo ao TB pode indicar infecções passadas, presentes ou vacinação com BCG (BURTON, 2012, KONEMAN et al., 2014).

O custo da PCR na rotina é viável, já que o diagnóstico rápido em pacientes paucibacilares permite o início de tratamento específico rapidamente, diminuindo assim as fontes bacilíferas. Vários elementos repetitivos do DNA que são responsáveis pela variação genética de estirpes foram descobertos em *M. tuberculosis* como, por exemplo, a inserção IS6110 e genes que codificam proteínas de 32 kDa, 38 kDa (gene *Pab*), 65 kDa (gene *GroEL*), a proteína MPB64 (23 kDa) e os genes *dnaJ* e *mtp 40*. A inserção IS6110 é a mais utilizada já que é uma sequência repetitiva no genoma do bacilo (de 1 a 20 cópias por célula) o que garante alta eficiência na PCR, visto que a sensibilidade de detecção aumentará em proporção ao número de cópias, o que se torna extremamente desejável em amostras paucibacilares (ASSIS et al., 2007; MACENTE; RIBEIRO, 2009). Atualmente no Brasil, tanto a rede privada quanto a pública adota o Teste Rápido Molecular (TRM), conhecido como *Xpert MTB/Rif*®, que detecta a presença do bacilo em duas horas, a partir da sequência específica do gene *rpoB* (codificador da subunidade beta da RNA polimerase), e identifica se há resistência a rifampicina, um dos principais antibióticos utilizados no tratamento. Os índices de sensibilidade e especificidade chegam a 92,5% e 99%, respectivamente (FREITAS et al., 2009; ADÉKAMBI et al., 2009; STEINGART et al., 2014)

Tabela 5: Lista dos principais alvos genômicos e técnicas moleculares disponíveis para a detecção de importantes patógenos de interesse médico.

MICRORGANISMO	PRINCIPAIS TÉCNICAS MOLECULARES	ALVO RECONHECIDO PELO PRIMER	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA
HIV	RT-Q PCR	MUTAÇÃO NO GENE <i>POL-1</i>	40 mil novos casos de AIDS nos últimos cinco anos (BRASIL, 2017a).
Influenza	qPCR PCR Multiplex FilmArray® Respiratory Panel	GLICOPROTEÍNAS CONSTITUINTES DO ENVELOPE LIPÍDICO DO VÍRUS (HEMAGLUTININA E NEURAMINIDASE)	Responsável por aproximadamente meio milhão de óbitos globais por ano entre pacientes imunocomprometidos (WHO, 2011).
<i>Candida</i>	PCR Convencional qPCR NESTED PCR	<i>5.8S/28S rDNA; ITS2; 18S rRNA; mp65; 18S rRNA, ITS; rpr1; 18S/28S rDNA</i>	Responsável por 90 a 95% das infecções fúngicas registradas em ambiente hospitalar (SIQUEIRA, 2012).
<i>Toxoplasma</i>	qPCR	<i>GENE B1</i> <i>GENE P30</i>	1/3 das pessoas seriam sorologicamente positivas (KOMPALIC-CRISTO et al., 2005).
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Xpert MTB/Rif ®	<i>GENE rpoB</i>	No Brasil, a cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil casos novos e ocorrem cerca de 4,5 mil mortes em decorrência da TB (BRASIL, 2017c).

Fonte: Elaborado pela autora.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando tudo que foi exposto ao longo deste trabalho, percebe-se que a PCR revolucionou a forma como se manipula os ácidos nucleicos, permitindo sua utilização no laboratório de análises clínicas, com rapidez, acurácia e eficiência, visando o melhor para diagnósticos de doenças que necessitam ter sua terapêutica iniciada o mais rápido possível, o que determina tempo de vida para o paciente imunodeprimido, além de impedir a prática de tratamento empírico, uma abordagem que leva ao uso indiscriminado de antimicrobianos e seleciona microrganismos resistentes, tornando tratamentos posteriores mais difíceis e dispendiosos. A técnica permite ainda reconhecer um patógeno de cultivo trabalhoso ou que se apresenta em reduzida quantidade na amostra clínica, além de reduzir o tempo de janela imunológica.

A rápida identificação da etiologia durante um surto ou epidemia, por exemplo, possibilita ainda ações epidemiológicas de contenção e prevenção, de suma relevância para a saúde pública de qualquer país. Também tornou possível determinar o genótipo do patógeno, proporcionando escolha de terapia adequada para cada espécie, diminuindo o tempo de internação, evitando gastos e sobrecarga ao sistema de saúde, além de traçar perfil de resistência, o que diante do cenário atual de resistência bacteriana e fúngica aos medicamentos utilizados, é de extrema importância. A detecção precoce minimiza ainda o potencial para disseminação da infecção tanto em ambiente hospitalar quanto comunitário

Porém, é válido ressaltar que as metodologias moleculares não excluem ou substituem metodologias já padronizadas e que promovem diagnóstico eficaz. A biologia molecular vem ajudar os analistas clínicos em situações específicas e deve ser considerada como complementar, levando em consideração que além do alto custo, a necessidade de execução em laboratórios com elevada tecnologia e com espaço exclusivo para a sua realização, são fatores limitantes no que diz respeito ao emprego do teste de PCR em situação ambulatorial ou hospitalar em um país em desenvolvimento como o Brasil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.
- ADÉKAMBI, T.; DRANCOURT, M.; RAOULT, D. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. **Trends in Microbiology**, v. 17, n.1, p. 37-45, Jan. 2009.
- AKERS, I.E.; WEBER, R.; SAX, H.; BÖNI, J.; TRKOLA, A.; KUSTER, S.P. Influence of time to diagnosis of severe influenza on antibiotic use, length of stay, isolation precautions, and mortality: a retrospective study. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, n.11, v. 4, p.337-344, Zurich, jul. 2017.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; ROBERTS, K.; WALTER, P.; RAFF, M. **Biologia Molecular da Célula**. 6ª edição. Porto Alegre: ArtMed, 2017. p. 473-474.
- ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 3: Principais Síndromes Infeciosas**, 2013. Disponível em :<<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/principais-sindromes-infeciosa>>. Acesso em: 06 jun 2018.
- ATKINS, S. D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, United Kingdom, v. 45, n.1, p. 3-15, May. 2004.
- ASSIS, N. C. S. et al. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 1-7, fev. 2007.
- AZEVEDO, A. C.; ANDRADE, C. F.; FILIPPIS I. Identificação dos principais agentes etiológicos das meningites bacterianas por PCR em tempo real. In: **V Seminário Anual Científico e Tecnológico Bio-Manguinhos**. Rio de Janeiro, 2017.
- BEIRIGO, A. P. T.; PEREIRA, I. S.; P. C. L. SILVA. INFLUENZA A (H1N1): REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**. v.12, n.2, p.53-67, Ago. 2017.
- BIOFIRE DIAGNOSTICS. **FilmArray Respiratory Panel**. 2018. Disponível em: <<http://www.biomerieux.com.br/sites/clinic/files/info-sheet-respiratory-panel-mrkt-prt-0229-04.pdf>>. Acesso em: 06 jun 2018.
- BRASIL a, Ministério Da Saúde. **Boletim epidemiológico HIV/Aids 2017**. Brasília. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hiv-aids-2017>>. Acesso em: 23 mai 2018.
- BRASIL b, Ministério Da Saúde. **Protocolo Clínico E Diretrizes Terapêuticas Para Manejo Da Infecção Pelo HIV Em Adultos**. Brasília, 1ª edição, 2017. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos>>. Acesso em: 31 maio 2018.

BRASIL c, Ministério Da Saúde. **TUBERCULOSE**, 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/tuberculose>>. Acesso em: 08 jun 2018.

BRASIL, Ministério Da Saúde. **Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis DST**. 4 ed. Brasília: 2006. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_controle_das_dst.pdf>. Acesso em: 01 jun 2018.

BURTON, G. R. W. **Microbiologia Para Ciências da Saúde**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

CAMPOS, K. R.; GONÇALVES, M.G.; FUKASAWA, L. O.; COSTA, N. A.; BARRETO-DAMIÃO, C. H.; MAGRI, M. C.; ALENCAR, W.K.; ARAUJO, A. C. Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 57-65, Oct. 2015.

CARLI, S.; MARX, C.; GREGIANINI, T. S.; LEHMANN, F. K. M.; LUNGE, V. R.; DAMBRÓS, B.P.; TUMIOTO, G. L.; IKUTA, N. **Deteção e caracterização do vírus influenza A (H1N1) pandêmico no Rio Grande do Sul nos anos de 2009 e 2011**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/64697/Poster_24429.pdf?sequence=2>. Acesso em: 28 maio 2018.

CARMO, E. F. S.; FIORINI, A. Principais Técnicas Moleculares Para Deteção Do Papilomavírus Humano. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, Maringá, v. 2, n.1, Jun. 2007.

CARNEIRO, A. C. A. V. **Caracterização Molecular de isolados de Toxoplasma gondii obtidos de crianças com toxoplasmose congênita no Estado de Minas Gerais**. 2011. 191 f. Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CAVALCANTI, M. P. C.; LORENA, V. M.B.; GOMES, Y. M. Avanços Biotecnológicos Para O Diagnóstico Das Doenças Infecciosas E Parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, Recife, v. 37, n. 1, 2008.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Tuberculosis (TB) Data and Statistics**. Atlanta, 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/tb/statistics/default.htm>>. Acesso em: 08 jun 2018.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Influenza Virus Testing Methods**. Atlanta, 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/professionals/diagnosis/table-testing-methods.htm>>. Acesso em: 28 maio 2018.

CORDEIRO, A. M. et al. Revisão Sistemática: uma revisão narrativa. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, Rio de Janeiro, v.34, n. 6, p. 428-431, dez. 2007.

CORLESS C.E.; GUIVER, M.; BORROW, R., EDWARDS-JONES, V.; FOX, A.J.; KACZMARSKI, E.B. Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. United Kingdom, v. 39, n. 4. p. 1553-8. apr. 2001.

COSTA, M. R. F., et al. Diagnóstico molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 41, n. 4, p. 381-385, Ago. 2008.

DANTAS, A. F. F. **Infeções respiratórias por vírus influenza na Região Autónoma da Madeira: diagnóstico e epidemiologia da infecção por vírus pandêmico 2009 Influenza A (H1N1)**. 2017. 117 f. Dissertação (Mestrado) em Biologia Molecular em Saúde Escola Superior de Saúde Egas Moniz, Almada, 2017.

DUNYACH, C.; BERTOUT, S.; PHELIPEAU, C.; et al. Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.60, n.3, p. 263-71, 2008.

FREITAS, F. A. D.; SIQUEIRA, H. R.; ALBANO, R. M. Métodos moleculares na tuberculose e resistência do *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista Pulmão**, v. 18, n.2, p. 96-101, 2009.

HAAS, D. J.; TORRES, A.C.D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 26, n. 0, 2016.

HERMES PARDINI. **MANUAL DE EXAMES**. 2016. Disponível em:<https://www3.hermespardini.com.br/repositorio/media/site/profissionais_da_saude/manual_imagem.pdf>. Acesso em: 30 maio 2018.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology Nature Publishing Company**, v.11, p. 1026-1030, 1993.

KOMPALIC-CRISTO, A.; BRITTO, C.; FERNANDES, O. Diagnóstico molecular da toxoplasmose: revisão. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 4, p. 229-235, Ago. 2005.

KONEMAN, E.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico**, 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2014.

KURITZKES, D.R.; GRANT, R.M.; FEORINO, P.; GRISWOLD, M.; HOOVER, M.; YOUNG, R.; DAY, S.; LLOYD, R.M. JR.; REID, C.; MORGAN, G.F.; WINSLOW, D.L. Performance characteristics of the TRUGENE HIV-1 Genotyping Kit and the Opengene DNA Sequencing System. *Journal of Clinical Microbiology* v. 41, n.4, p. 1594-9. Apr. 2003.

MACEDO, O., et al. Genotipagem da resistência genotípica secundária aos antirretrovirais em pacientes com aids nos Estados do Pará e Amazonas, Brasil: 2002 a 2006. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 2, n. 3, p. 27-34, set. 2011.

MACENTE, S.; RIBEIRO, F.H.M. Diagnóstico Molecular De *M. tuberculosis*: Uma Revisão de Técnicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 2, n. 2, p. 225 -231, mai. /ago. 2009

MARCOS, P.; HUARINGA, M.; ROJAS, N.; GUTIÉRREZ, V.; RUITON, S.; GALLARDO, E.; et al. Detección de Virus Influenza A B y Subtipos A (H1N1) Pdm09, A (H3N2) por Múltiple RT-PCR en Muestras Clínicas. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.34, n. 2, p. 192-200, jun. 2017.

MARQUES, A. L. P. **Uso da biologia molecular no diagnóstico da doença de Chagas: uma abordagem teórico-experimental com foco em qPCR**. 2016. 158f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

MELHEM, M.S.C.; GIANNINI, M.J.S.M.; ALMEIDA, A.M.F. Aplicação de Métodos de Biologia Molecular em Micologia Médica. In: Zaitz, C.; Campbell, I.; Marques, S.A.; Ruiz, L.R.B.; Framil, V.M.S. **Compêndio de Micologia Médica**. 2ed. Guanabara: Rio de Janeiro. 2010, p.50-74.

MELLO, R. G. **Padronização da RT-PCR duplex, multiplex e nested para detecção dos vírus zika, dengue e chikungunya**. 2017. 44f. TCC (graduação) da Universidade Federal de Grande Dourados, Dourados, 2017.

MELLO, W. A. O papel do diagnóstico laboratorial da influenza. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 1, n. 1, p. 191-193, mar. 2010

METWALLY, L.; HOGG, G.; COYLE, P. V., et al. Rapid differentiation between fluconazole-sensitive and -resistant species of *Candida* directly from positive blood culture bottles by real-time PCR. **Journal of Medical Microbiology** v. 56, n. 7, p.964–70, 2007.

MOLINA, A.L.; TOBO, P. R. **Série Biologia Molecular Parte 2- Uso das Técnicas de biologia molecular para diagnóstico**. Hospital Israelita Albert Einstein. São Paulo, 2004.

MUGNOL, K. C. U.; FERRAZ, M. B. Sistema de informação como ferramenta de cálculo e gestão de custos em laboratórios de análises clínicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 95-102, 2006.

MULLIS, K.B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, Paris, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Real time PCR and RT-PCR technology and its applications in the medicine field. **Revista Brasileira de Medicina**, v.67, p. 7-19, Nov. 2010.

NEGRO, G. M. B. D. **Identificação de cinco espécies de *Cândida* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por hemoculturas em pacientes pediátricos com risco para candidemia**. 2009. 109f. Tese (Doutorado em Pediatria) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado) do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

OKAY, T. S.; GRANATO, C. F. H. O diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) em crianças entre dois e 24 meses. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 298-299, Out. 2000.

POROCA, D. R, et al. Diferenciação de micobactérias por PCR multiplex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 6, p. 716-722, Dec. 2009.

QUARESMA, P. F. **Diagnóstico Molecular Da Leishmaniose Visceral Canina E Quantificação Da Carga Parasitária Através Da Reação Em Cadeia Da Polimerase**. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2007.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROCHE MOLECULAR SYSTEMS. **Compare and Contrast: Multiplex vs. Singleplex PCR**. 2015. Disponível em: < https://lifescience.roche.com/en_br/blog/lab-life/real-time-pcr/compare-and-contrast-multiplex-vs-singleplex-pcr.html>. Acesso em: 30 maio 2018.

ROSELINO, A. M. Biologia molecular aplicada às dermatoses tropicais. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 187-203, 2008.

RUIZ, L. S.; PEREIRA, V. B. R. Importância dos fungos no ambiente hospitalar. **Boletim Instituto Adolfo Lutz**, ano 26, artigo 2, 2016. Disponível em:http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_26/bial_26u_2016.pdf. Acesso em 08 jun 2018.

SANTOS, T. T.; MENDES, L.C.; VARAVALLO, M.A. Implantação De Diagnóstico Molecular De Doenças Infecciosas E Parasitárias Em Laboratórios De Análises Clínicas – Dificuldades E Aspectos Relacionados. **Revista Cereus**, Gurupi, n.6, 2012.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. V.; WIGG, M. D. **Virologia Humana**, 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

SEGURADO, A. C.; CASSENOTE, A. J.; LUNA, E. A. Saúde nas metrópoles - Doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 30, n. 86, p. 29-49, Apr. 2016 .

SIQUEIRA, J.P.Z. **Biologia Molecular Como Ferramenta Para O Diagnóstico De Fungemias: Padronização De Protocolos E Comparação Com métodos Convencionais**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2012.

SILVA, C. D. R.; JÚNIOR, M. S. Estratégias para uso adequado de antibioticoterapia em unidade de terapia intensiva. **Einstein**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 448-453, 2015.

STEINGART, K. R.; SCHILLER, I.; HORNE, D.J.; PAI, M.; BOEHME, C.C.; DENDUKURI, N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Liverpool, Jan. 2014.

SUAREZ, D.L.; DAS, A.; ELLIS, E. Review of Rapid Molecular Diagnostic Tools for Avian Influenza Virus. **American Association of Avian Pathologists**. v. 51, n.1 p.201–208, Athens, 2007.

TAO, S.C.; JIANG, D.; LU, H.L.; XING, W.L.; ZHOU, Y.X.; 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**, v. 26, p. 179-183, 2004.

TAKAHASHI, J. P. F.; BECEGATO, E.Z.; ROCHA, N.; KIMURA, L. M.; FERNANDES, K.R.; GUERRA, J. M. A biologia molecular como ferramenta para identificação fúngica em amostras de tecido. **Boletim Instituto Adolfo Lutz**, ano 26, artigo 13, 2016. Disponível em:http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_26/bial_26u_2016.pdf. Acesso em 08 jun 2018.

TERRA, A. P. S., et al. Monitoramento de pacientes com AIDS para o desenvolvimento de doença por citomegalovírus (CMV) usando-se PCR multiplex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 6, p. 583-589, Dez. 2000.

VAN DER POL, B.; KRAFT, C. S.; WILLIAMS, J. A. Use of an adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of Chlamydia and gonorrhoea to detect Trichomonas vaginalis in urogenital specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.2, p.366-373, 2006.

VALONES, M. A. A. ; GUIMARÃES, R. L. ; BRANDÃO, L. A. C. ; SOUZA, P. R. E. ; CARVALHO, A. A. T. ; CROVELA, S. Principles And Applications Of Polymerase Chain Reaction In Medical Diagnostic Fields: A Review. **Brazilian Journal of Microbiology**, Recife, v. 40, n.1, Fev. 2009.

WENGENACK, N. L.; BINNICKER, M. J. Fungal molecular diagnostics. **Clinics In Chest Medicine**, Rochester, v. 30, n. 2, p. 391-408, Jun. 2009.

WHO (World Health Organization). **Global tuberculosis report**, 2017. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259366/9789241565516-eng.pdf;jsessionid=DE4CB6B258BEC76A2245F2C246BDA2B9?sequence=>](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259366/9789241565516-eng.pdf;jsessionid=DE4CB6B258BEC76A2245F2C246BDA2B9?sequence=)>. Acesso em: 08 jun 2018.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-Based Diagnostics for Infectious Diseases: Uses, Limitations and Future Applications in Acute-care Settings. **Lancet Infectious diseases**, New York, v. 4, n.6, p. 337-348, Jun. 2004.

XAVIER, M. O; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Capítulo 1 - Diagnóstico laboratorial das micoses pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 35, n. 9, p. 907-919, 2009.