

RESUMO

A pneumonia permanece como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade a nível mundial, apesar dos avanços no conhecimento da sua etiologia, epidemiologia e tratamento.

São inúmeros os agentes responsáveis por esta entidade; no entanto, a sua etiologia permanece indeterminada em mais de 50% dos casos.

Actualmente, é consensual que um diagnóstico etiológico tem não só implicações a nível individual, como em termos epidemiológicos.

Os métodos de diagnóstico etiológico tradicionais não satisfazem as necessidades actuais. São demorados, pouco sensíveis e específicos, não distinguem entre infecção e colonização e são influenciados por antibioterapia prévia. Cerca de 6 a 15% dos doentes hospitalizados por pneumonia adquirida na comunidade não responde a antibioterapia empírica e o insucesso da terapêutica pode ser superior a 40% em doentes com maior número de critérios de gravidade.

É neste contexto que surge a necessidade da aplicação de métodos moleculares ao diagnóstico de pneumonia, como as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, inicialmente a *Polymerase Chain Reaction*, com posterior desenvolvimento de variantes desta técnica e métodos de *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*, análises *multiplex*, técnicas *real-time*, métodos quantitativos e *DNA microarrays*.

Com este trabalho pretende-se fazer uma revisão teórica dos métodos rápidos de diagnóstico etiológico de pneumonia, comparando-os aos métodos tradicionais, evidenciando a sua utilidade na prática clínica, como meio de reduzir o recurso a antibioterapia empírica, através de uma célere identificação dos agentes etiológicos, diminuindo a morbidade e mortalidade.

ABSTRACT

Despite advances in knowledge of etiology, epidemiology and treatment, pneumonia remains a major cause of morbidity and mortality worldwide.

There are a number of organisms responsible for this disease; still its etiology remains undetermined in more than 50% of the cases.

It is now clear that a specific diagnosis has implications not only individually but also epidemiologically.

Traditional methods for etiological diagnosis do not meet current needs. They are time consuming, have low sensitivity and specificity, do not distinguish between infection and colonization and are influenced by previous antibiotic therapy. About 6 to 15% of patients hospitalized with community-acquired pneumonia do not respond to empirical antibiotic therapy and therapeutic failure may be greater than 40% in patients with more severity criteria.

It was in this setting, that the need arose for the application of molecular methods to the diagnosis of pneumonia, such as nucleic acid amplification techniques, initially the *polymerase chain reaction*, with the subsequent development of its variants and *Nucleic Acid Sequence Based Amplification*, *multiplex* assays, *real-time* and quantitative methods and *DNA microarrays*.

This work's aim is to review the current state of rapid methods for etiologic diagnosis of pneumonia, comparing them to traditional methods. Focus is given to their clinical usefulness as a means to reduce empirical antibiotic therapy and as a tool for rapid identification of etiological agents, reducing morbidity and mortality.

PALAVRAS-CHAVE: pneumonia, diagnóstico molecular, testes de amplificação de ácidos nucleicos, *PCR*, *NASBA*, *multiplex*, *real-time*

INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no conhecimento da etiologia, epidemiologia e tratamento de pneumonia, esta permanece como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade a nível mundial. (Nolte 2008) Estima-se que a taxa global anual de pneumonia adquirida na comunidade (PAC) varie entre 8 e 15 pessoas por cada 1000, com maior incidência nos extremos etários (Marrie 2009).

A pneumonia é responsável por um elevado número de casos nos Serviços de Urgência e uma importante causa de internamento, estando associada a morbidade e mortalidade consideráveis, nomeadamente em idosos e doentes com outras co-morbilidades. São inúmeros os agentes responsáveis por esta entidade; no entanto, a sua etiologia permanece indeterminada em mais de 50% dos casos (Nolte 2008).

Principais agentes etiológicos de PAC (Marrie 2009)

<ul style="list-style-type: none">▪ Bactérias típicas:<ul style="list-style-type: none">– <i>Streptococcus pneumoniae</i>– <i>Haemophilus influenzae</i>– <i>Staphylococcus aureus</i>– <i>Streptococcus grupo A</i>– <i>Moraxella catarrhalis</i>– Bactérias anaeróbias– Bactérias Gram-negativas aeróbias▪ Bactérias atípicas:<ul style="list-style-type: none">– <i>Mycoplasma pneumoniae</i>– <i>Legionella pneumophila</i>– <i>Chlamydia pneumoniae</i>▪ Outras bactérias:<ul style="list-style-type: none">– <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<ul style="list-style-type: none">▪ Vírus:<ul style="list-style-type: none">– <i>Influenza A e B</i>– <i>Parainfluenza</i>– <i>Vírus Sincicial Respiratório</i>– <i>Adenovirus</i>– <i>Rinovirus</i>▪ Fungos:<ul style="list-style-type: none">– <i>Aspergillus fumigatus</i>– <i>Histoplasma capsulatum</i>– <i>Coccidioides immitis</i>– <i>Pneumocystis jirovecii</i>
---	--

As bactérias são tradicionalmente divididas em dois grupos, típicas e atípicas. No entanto, devido à incapacidade de distinção clínica e radiológica entre pneumonia devida a estes dois grupos, a designação de “pneumonia atípica” não deve ser utilizada (Marrie 2009).

Actualmente, é consensual que o tratamento dirigido a um agente etiológico específico produz melhores resultados, sendo que uma antibioterapia não eficaz está associada a aumento de morbilidade e mortalidade, de efeitos adversos, resistências e custos. O diagnóstico etiológico tem não só implicações a nível individual, como em termos epidemiológicos.

Existe uma grande variedade de técnicas e procedimentos para detecção dos agentes etiológicos de pneumonia.

Os métodos de diagnóstico etiológico tradicionais - exame directo, cultura de expectoração, hemoculturas e pesquisa de antígenos, não satisfazem as necessidades actuais, devido à sua baixa sensibilidade e especificidade e à impossibilidade de disponibilizarem resultados em tempo considerado útil. Cerca de 6 a 15% dos doentes hospitalizados por PAC não responde a antibioterapia empírica nas primeiras 72 horas, sendo que o insucesso da terapêutica pode ser superior a 40% em doentes com maior número de critérios de gravidade. Nestes doentes, a taxa de mortalidade é substancialmente superior (Mandell, Wunderink e Anzueto 2007) (Roson, Carratala e Fernandez-Sabe 2004) (Menendez, Torres e Zalacain 2004).

Adicionalmente, nos últimos anos, um considerável número de agentes respiratórios foi identificado, cuja cultura *in vitro* é demorada e muitas vezes impossível de realizar, como o *Metapneumovirus humano*, *Coronavirus NL63 e HKU1*, *Bocavirus humano*, entre outros. (J. B. Mahony 2008)

É neste contexto que surge a aplicação de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) ao diagnóstico de pneumonia. Inicialmente com recurso a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), com posterior desenvolvimento de variantes desta técnica, métodos de *Nucleic Acid Sequence Based Amplification* (NASBA), análises *multiplex*, técnicas *real-time*, métodos quantitativos e *DNA microarrays*.

Com este trabalho pretende-se fazer uma revisão teórica dos métodos rápidos de diagnóstico etiológico de pneumonia, comparando-os aos métodos tradicionais, evidenciando a sua utilidade na prática clínica, como meio de reduzir o recurso a antibioterapia empírica, através de uma célere identificação dos seus agentes etiológicos, diminuindo a morbilidade e mortalidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi elaborado com base em pesquisa de referências bibliográficas na *PubMed*. Esta foi elaborada usando como critérios de pesquisa as palavras-chave: “respiratory tract infection AND pneumonia AND molecular diagnostic techniques”. Foram introduzidos os limites: “humans”, “core clinical journals” e “english”. Foi ainda efectuada pesquisa de “*multiplex*”, “*real-time*”, “*microarrays*” e uma pesquisa individualizada por agente etiológico.

A pesquisa foi alargada com a consulta de referências bibliográficas, consideradas de interesse, dos artigos anteriormente seleccionados.

Foram ainda consultadas as bases de dados *online* de várias publicações de referência, nomeadamente “UpToDate”, “New England Journal of Medicine”, “Lancet”, “Thorax” e “Annals of Internal Medicine”.

PRINCÍPIOS BÁSICOS DAS TÉCNICAS MOLECULARES

AMOSTRAS

A sensibilidade dos testes moleculares varia com a amostra testada. As amostras de eleição são os aspirados nasofaríngeos, expectoração (Covalciuc, KH e CA 1999), assim como o lavado broncoalveolar, quando disponível. (Ieven 2007)

A superioridade dos aspirados nasofaríngeos foi claramente ilustrada num estudo de Gruteke *et al.* (2004), em que a percentagem de diagnósticos foi de 84% quando usados aspirados nasofaríngeos e 58% quando usadas amostras de expectoração. (Ieven 2007)

Podem ainda ser usadas amostras de sangue (sangue total, soro, plasma, leucócitos periféricos) e urina. No entanto, a sua utilidade depende do agente etiológico e do estágio da doença. Estas amostras têm a vantagem de poderem ser facilmente obtidas. (D. R. Murdoch 2003)

MÉTODOS MOLECULARES TRADICIONAIS

Um dos primeiros métodos aplicados ao diagnóstico de pneumonia foi o *restriction fragment length polymorphism* (RFLP). Nesta técnica o DNA é digerido por enzimas de restrição, gerando fragmentos de diferentes dimensões, sendo o padrão destes analisado por electroforese em gel.

Posteriormente esta técnica foi adaptada para gerar fragmentos de DNA de maiores dimensões, que são separados por *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE).

Ambas as técnicas, RFLP e PFGE necessitam de crescimento do microrganismo em cultura, tendo por isso maior utilidade na identificação de estirpes e descrição das vias de transmissão de doença, do que para o diagnóstico clínico.

MÉTODOS TRADICIONAIS DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

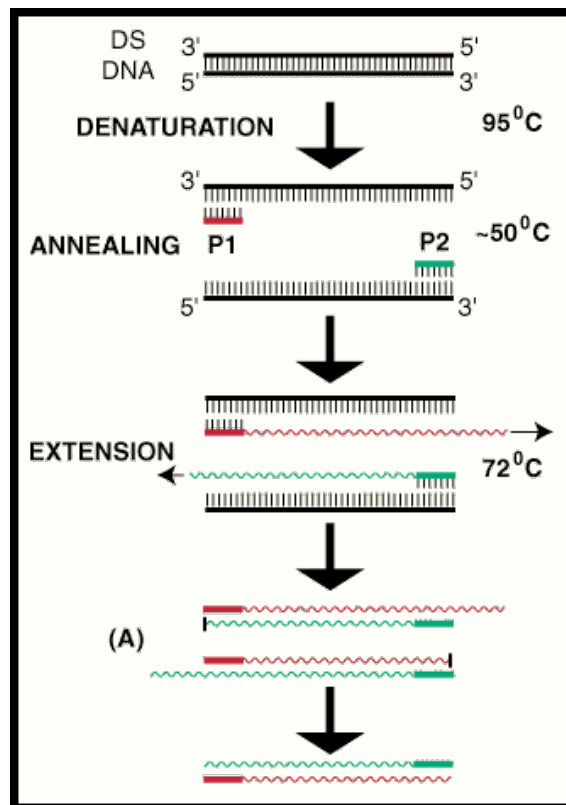
As NAATs tradicionais envolvem três passos: preparação da amostra, incluindo a extração do ácido nucleico, amplificação deste, e detecção/identificação dos produtos obtidos.

Simplex – testes de alvo único

Polymerase Chain Reaction (PCR)

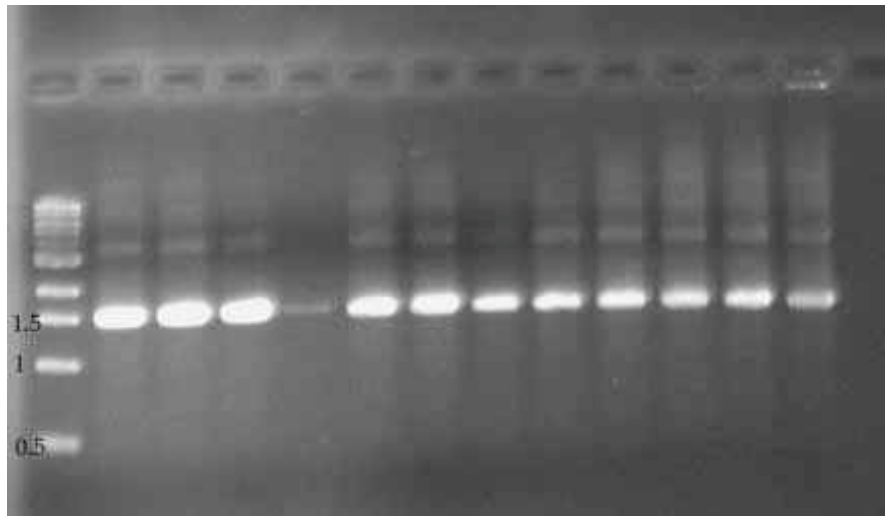
A PCR foi a primeira técnica desenvolvida para a amplificação de ácidos nucleicos, sendo ainda a mais comum e a mais usada. Este facto deve-se à sua generalização, antes do aparecimento de métodos alternativos.

Consiste em três passos fundamentais: desnaturação do DNA, ligação dos *primers* às sequências-alvo, extensão dos *primers* pela DNA-polimerase e produção de uma cópia do gene-alvo.



PCR. Adaptado de *Cowrie Genetic Database Project*

Inicialmente, a detecção dos produtos baseava-se na electroforese em presença de brometo de etídeo, visualizando-se as bandas resultantes com radiações UV, seguidamente comparadas com padrões conhecidos. O recurso à hibridização com sondas marcadas permite a identificação dos produtos de amplificação com maior especificidade. Este processo é demorado, envolvendo múltiplos passos, o que aumenta o risco de contaminação. Como alternativa, os produtos obtidos podem ser capturados em fase sólida e detectados por imunoenaios enzimáticos, sendo mais conveniente para o estudo de grandes lotes de amostras.



Electroforese em gel. Adaptado de *Project GROWS*

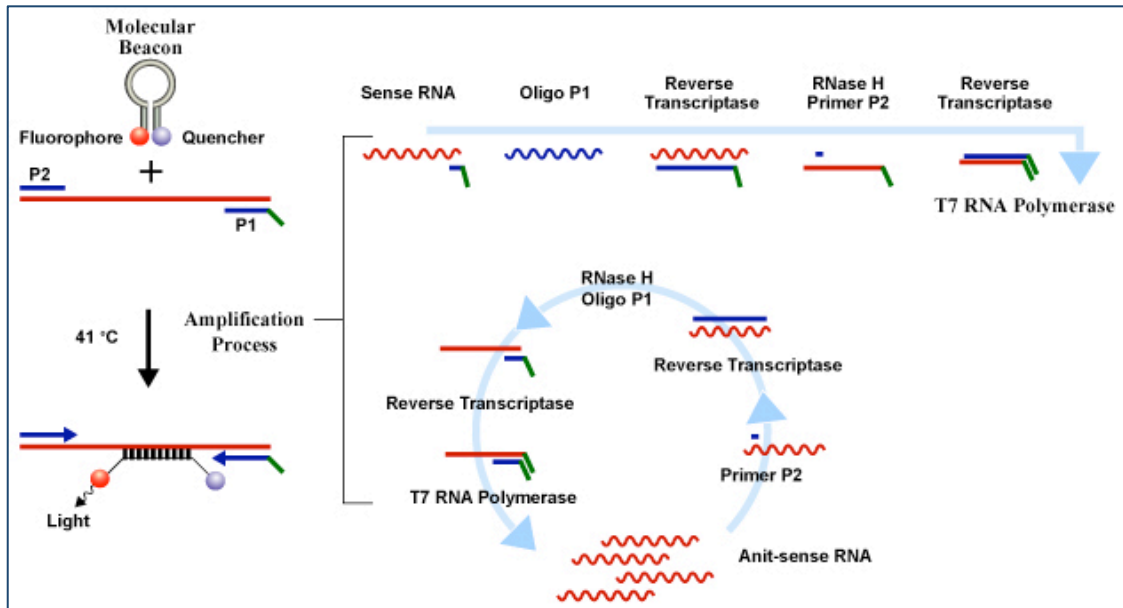
A PCR apresenta algumas limitações. A sua elevada sensibilidade pode resultar em falsos-positivos, por contaminação exógena, amplificação de DNA de organismos colonizadores presentes em baixas quantidades na amostra ou pela amplificação de DNA de microrganismos com sequências genómicas semelhantes às do alvo. Outra desvantagem é a possibilidade limitada de execução de testes de sensibilidade a fármacos.

Técnicas variantes de PCR

Variantes de PCR	Técnica	Vantagens	Desvantagens
<i>Nested</i> <i>Semi-nested</i>	<ul style="list-style-type: none"> • São executadas 2 PCR's • A segunda PCR usa os produtos da primeira reacção como molde de amplificação (<i>nested/semi-nested</i>) • Os <i>primers</i> da segunda reacção podem ser diferentes dos da primeira (<i>nested</i>) ou um dos <i>primers</i> pode ser o mesmo (<i>semi-nested</i>). 	<ul style="list-style-type: none"> • Maior sensibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de manipulação dos tubos entre as duas reacções
Reverse-transcriptase (RT-PCR)	<ul style="list-style-type: none"> • Síntese de cDNA a partir de RNA por transcrição reversa • Amplificação de cDNA específico por PCR 	<ul style="list-style-type: none"> • Mais útil e sensível para detecção e quantificação de mRNA • Usada na detecção de vírus e avaliação da viabilidade de células microbianas, visto o RNA ser rapidamente degradado após a morte celular 	
<i>Broad range</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Usa <i>primers</i> seleccionados de regiões conservadas de um gene particular, partilhado por um determinado grupo taxonómico, como o gene <i>16S rRNA</i> ou o gene <i>23S rRNA</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Detecção específica de microrganismos 	<ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de selecção de <i>primers</i> específicos • Pouca informação disponível

Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)

O RNA é amplificado pela acção simultânea de três enzimas: uma transcriptase reversa com actividade de polimerase, uma RNase e uma RNA-polimerase. O produto de amplificação é um RNA de cadeia simples, que pode ser detectado por *enzyme-linked gel assay* ou imunolectroluminescência (Ieven e Loens, 2006).



Técnica NASBA. Adaptado de *PREMIER Biosoft International*

Uma vantagem desta técnica relativamente à PCR é a de ser um processo contínuo, isotérmico, que não necessita de termociclador, permitindo que cada passo se possa processar assim que um produto intermédio da reacção se torna disponível.

Adicionalmente, o RNA é um material genómico de vários vírus respiratórios, daí a sua utilidade.

A aplicação de técnicas de amplificação de RNA oferece vantagens comparativamente às técnicas de DNA: a ausência de necessidade de passo adicional com o uso de transcriptase reversa poupa tempo e reduz o risco de contaminação. Contudo, a especificidade das reacções pode ser menor devido à termolabilidade das enzimas utilizadas, não devendo a temperatura exceder os 42°C. Não obstante, a especificidade pode ser potenciada através da hibridização adicional com sondas alvo-específicas.

***Multiplex* – testes de alvo múltiplo**

Na PCR *multiplex* diversas amplificações independentes são executadas simultaneamente num único tubo recorrendo a uma mistura de *primers*.

Contudo, dados indicam que o aumento do número de alvos numa reacção leva a uma perda de sensibilidade (Tong e Donnelly 1999) (Vernet 2004). Tong *et al.* observaram uma perda de sensibilidade de cerca de 1 *log* para detecção de *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*, quando comparado com PCR *simplex*. Em amostras respiratórias, a sensibilidade da análise *multiplex* para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia psittaci* foi de 82%, 100% e 86%, respectivamente. (Tong e Donnelly 1999) Vernet observou que a sensibilidade de uma RT-PCR *multiplex* para a detecção de 6 vírus (*Influenza A e B*, *Vírus Sincicial Respiratório A/B*, *Parainfluenza 1, 2 e 3*) é reduzida por um factor de 1-2 *log* comparativamente com detecções *simplex*, dependendo do vírus. No entanto, a análise *multiplex* foi capaz de identificar correctamente 95% dos agentes infecciosos nas amostras respiratórias. Esta diminuição da sensibilidade não é inesperada, devido à presença de diversos pares de *primers*, aumentando a probabilidade de emparelhamento erróneo. (Vernet 2004)

Metodologias recentes combinam PCR convencional com detecção por *microarrays*, como foi descrito por Li *et al.* (2007). Este grupo avaliou positivamente dois painéis *multiplex* comerciais, *NGEN* e *ResPlex II* para detecção de 6 e 12 vírus e seus serótipos, combinados com técnicas de identificação por *microarray*. A sensibilidade destes dois painéis foi mais baixa do que análises *real-time* RT-PCR *simplex*, sendo esta diferença mais notória para os vírus *Sincicial Respiratório* e *Parainfluenza 3*. Apesar de estes testes poderem ser melhorados com a optimização de *primers* e sondas, as alterações na sequência podem influenciar

negativamente outras análises incluídas na técnica *multiplex*. Estas técnicas de PCR convencional combinadas com *microarrays* estão em competição com reacções *real-time multiplex*, e em muitos casos a ser substituídas por estas, devido à sua maior ergonomia (Ieven 2007).

TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS REAL-TIME

Simplex – testes de alvo único

A combinação do uso de tubo capilar aquecido e sondas fluorogénicas, resulta num considerável aumento da rapidez da *real-time* PCR. Com a amplificação e detecção executadas simultaneamente em tubo selado, sem necessidade de manipulação adicional, elimina-se o risco de contaminação. Esta técnica permite a obtenção de resultados em menos de uma hora.

A detecção em *real-time* por marcadores moleculares é também aplicável à técnica NASBA.

Em vários estudos, a sensibilidade e a especificidade da *real-time* PCR mostrou ser idêntica à PCR convencional, nomeadamente para detecção de *Legionella pneumophila* (Hayden, Uhl e Qian 2001), *Mycoplasma pneumoniae* (Templeton e Scheltinga 2003a) (Ursi, K e Loens 2003) e *Vírus Sincicial Respiratório* (Mentel, Wegner e Bruns 2003). Alguns estudos sugerem que a *real-time* PCR tem uma sensibilidade superior em comparação com PCR convencional para detecção de *Rinovirus* (Dagher, Donninger e Hutchinson 2004) e *SARS-Coronavirus* (Poon, Wong e Chan 2003).

Multiplex – testes de alvo múltiplo

O número de agentes que pode ser detectado simultaneamente num único tubo de reacção *real-time* PCR é limitado pelo número de comprimentos de onda disponíveis no equipamento. No entanto, várias reacções podem ser executadas em paralelo. Uma das desvantagens é o aumento do tempo necessário para a manipulação de todos os tubos e a necessidade de empregar temperaturas sub-óptimas para alguns reagentes. Em todas as análises simultâneas é necessário um compromisso entre as exigências de temperatura óptima do ciclo e a sensibilidade de cada componente.

Um dos primeiros testes *real-time* PCR *multiplex* foi desenvolvido por Welti *et al.* (2003), para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila*. Uma análise *real-time* NASBA *multiplex* para a detecção destes três agentes foi desenvolvido por Loens *et al.* Ambos os grupos compararam os testes *multiplex* com os correspondentes monoensaios. A sensibilidade da *real-time* PCR *multiplex* foi idêntica à *real-time* PCR *simplex*, no entanto a *real-time* NASBA *multiplex* mostrou-se menos sensível comparativamente com a correspondente *real-time* NASBA *simplex* (Ieven 2007).

Nos últimos anos, vários investigadores têm desenvolvido testes *multiplex* (Gruteke, Glas e Dierdorp 2004); (Templeton, Scheltinga e van den Eeden 2005); (Gunson, Collins e Carmen 2005). No entanto, é fundamental averiguar quais dessas reacções são passíveis de ser combinadas sem perda de sensibilidade (Ieven 2007).

TESTES QUANTITATIVOS

Nas *real-time* NAATs, o limite do ciclo está relacionado com o número de microrganismos presentes na amostra. Em amostras padronizadas, a comparação entre os valores limites do ciclo permite a quantificação relativa da carga de microrganismo. Este dado pode ser clinicamente relevante no seguimento da infecção num determinado doente.

Para a quantificação absoluta, vários padrões foram usados no passado. Actualmente, o método mais popular são plasmídeos clonados em laboratório. O DNA é quantificado e o número correspondente de moléculas alvo é calculado. A construção de curvas padrão (Fronhoffs, Totzke e Stier 2002) permite a quantificação absoluta expressa em número de partículas de microrganismos (Vijgen, Keyaerts e Moes 2005).

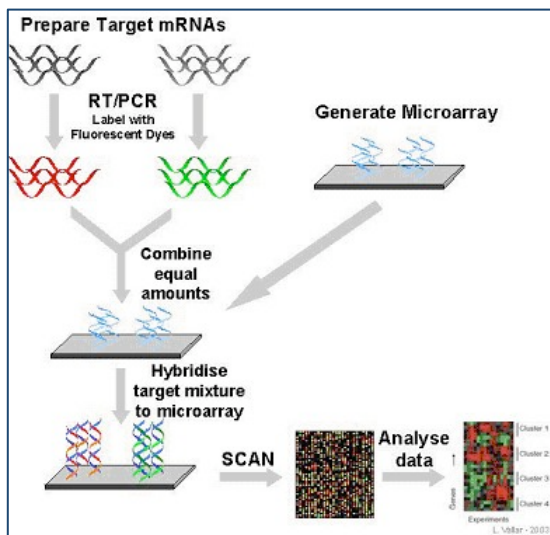
Estes testes permitem a interpretação dos resultados positivos, através da quantificação de microrganismos e estabelecimento de limites para distinção entre colonização e infecção (Chan e Morris 2007).

Actualmente, os estudos quantitativos indicam que a cargas virais elevadas correspondem apresentações clínicas mais severas.

DNA MICROARRAYS

Recentemente, o maior avanço no diagnóstico molecular foi o desenvolvimento de *microarrays* de DNA. Contudo, esta técnica ainda não está completamente desenvolvida para o diagnóstico etiológico de pneumonia.

Esta tecnologia surge do crescente conhecimento das sequências genómicas dos agentes patogénicos. Consiste em reacções paralelas, realizadas em meios pequenos, permitindo a hibridização de múltiplos alvos no mesmo ensaio. Os *DNA microarrays* são usados para identificar ou quantificar uma determinada sequência de nucleótidos numa amostra inicialmente marcada com um corante fluorescente. Seguidamente, ocorre hibridização com o *microarray* que contém sondas de sequências complementares. A quantidade de amostra hibridizada é quantificada pela intensidade do sinal.



Técnica *microarray*.

Adaptado de *The Microarray Center*



Chips de microarray.

Adaptado de *Affymetrix GeneChip*

Uma área actualmente em desenvolvimento é a *microarrays* de detecção de genes. Estes são usados para detecção de sequências específicas de uma determinada espécie, regiões de virulência ou genes que codificam resistência a antibióticos. A informação obtida por estes *microarrays* tem um impacto directo no tratamento dos doentes.

A técnica de *single nucleotide polymorphism* (SNP) *microarray* é usada na identificação de mutações, nomeadamente de um grupo limitado de polimorfismos genéticos que divide as

estirpes de *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA) (Barken, Haagensen e Tolker-Nielsen 2007). Adicionalmente, encontra-se também em estudo a sua aplicação na detecção de resistência à Isoniazida e Rifampicina pelo *Mycobacterium tuberculosis*, (Barken, Haagensen e Tolker-Nielsen 2007) o que permitirá melhorar o controlo desta doença.

As plataformas de *microarray* ainda não estão disponíveis para a rotina clínica, pois são técnicas excessivamente caras e trabalhosas. No entanto, a constante diminuição dos preços e crescente automatização das técnicas permitirá, num futuro próximo, a sua generalização à prática clínica.

CONTROLO EXTERNO DE QUALIDADE

Todos os testes desenvolvidos laboratorialmente devem ser verificados em termos do seu desempenho clínico e analítico. Como ilustrado por alguns estudos, existe a necessidade de padronização do material, particularmente em testes quantitativos e a sua participação em programas externos de controlo de qualidade.

No que diz respeito aos métodos moleculares, a principal preocupação prende-se com os resultados falsos-positivos resultantes de contaminação, ainda que a preparação automática das amostras e as *real-time* NAATs representem um significativo avanço neste campo. A presença de resultados falsos-negativos está associada a grandes diferenças de sensibilidade dos testes desenvolvidos no próprio laboratório (Apfalter, Reischl e Hammerschlag 2005); (Loens, Beck e Ursi 2006c); (Templeton, Scheltinga e Van den Eeden 2005); (Van Vliet, Muir e Echevarria 2001).

MARCADORES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

A resistência bacteriana a antibióticos tem-se tornado num tópico de crescente importância. Cientistas prevêem que com a emergência da era “pós-antibiótica” será muito difícil controlar infecções comuns, devido ao aparecimento de organismos multirresistentes.

Consequentemente, tem vindo a existir um interesse crescente na detecção molecular de resistência a antibióticos, particularmente quando o agente etiológico apresenta crescimento *in vitro* difícil. Vários estudos têm sido desenvolvidos nesta área, nomeadamente por Fluit *et al.* (2001). Actualmente, a nível hospitalar, existe uma grande preocupação com a ocorrência de infecções por MRSA. Vários investigadores desenvolveram métodos moleculares para detecção de MRSA através do uso da PCR, tendo como alvo o gene *mecA* (Millar, Xu e Moore 2007).

No que concerne aos vírus, dois tipos de ensaios para testar a resistência a fármacos têm sido desenvolvidos: testes genotípicos e testes fenotípicos. Estes permitem estabelecer o perfil de resistência a fármacos, tanto em doentes não previamente tratados, como em casos de recorrência viral pós-tratamento. Permitem ainda identificar o aparecimento de novas resistências que necessitem de alteração da terapêutica em curso (Mirken 1997). Múltiplos estudos têm mostrado que ambos os testes fornecem informações úteis, melhorando o prognóstico a curto prazo de doentes em vias de iniciar um determinado regime anti-viral (Ratcliff, Chang e Kok 2007).

BACTÉRIAS

INTRODUÇÃO

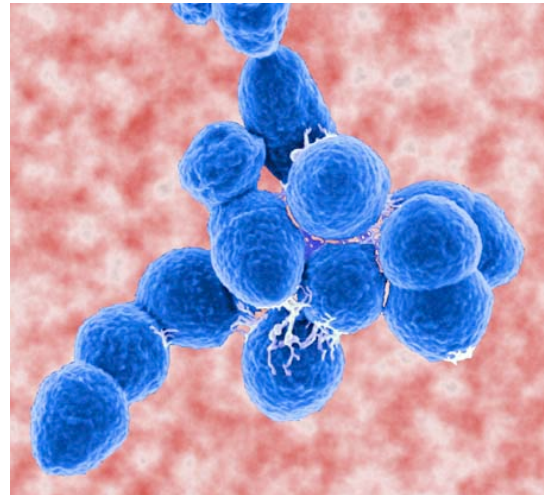
O diagnóstico diferencial entre os diferentes agentes bacterianos é uma prioridade de saúde pública, devido às elevadas taxas de morbidade e mortalidade, associadas a pneumonia bacteriana. Estima-se que nos EUA a cada ano, 500.000 hospitalizações e 40.000 mortes se devam a esta entidade. (Benson, Tondella e Carvalho 2008)

Clinicamente não é possível diferenciar os múltiplos agentes etiológicos de pneumonia e, numa percentagem significativa dos casos, os métodos tradicionais de diagnóstico não são esclarecedores. Vários estudos sugerem que 16 a 53% das pneumonias com um diagnóstico etiológico não determinado estão associadas a antibioterapia prévia (Benson, Tondella e Carvalho 2008).

O diagnóstico convencional baseia-se em métodos de cultura. Contudo, estes são demorados e muitas espécies não crescem com facilidade *in vitro*. Para além disso, não permitem a distinção entre infecção e colonização, e apresentam grande número de falsos-negativos em doentes já sob antibioterapia. (Chan e Morris 2007)

Os testes moleculares, com capacidade de identificar múltiplas bactérias simultaneamente, aumentam a capacidade diagnóstica e permitem o uso de antibioterapia adequada. Adicionalmente, são úteis na determinação de resistência a fármacos e identificação de epidemias, auxiliando no controlo de infecções.

Streptococcus pneumoniae



O *Streptococcus pneumoniae* foi isolado independentemente por Pasteur e Steinberg há mais de um século.

Esta bactéria é responsável por cerca de dois terços dos casos de pneumonia adquirida na comunidade, nos quais o agente etiológico é identificado (Nolte 2008).

A sua identificação precoce e exacta é difícil, devido às limitações dos métodos tradicionais. Culturas de expectoração e sangue são técnicas demoradas, apresentando baixa sensibilidade, particularmente em doentes com antibioterapia prévia. Falsos-positivos em culturas de expectoração são comuns, devido à contaminação por bactérias comensais da orofaringe.

A pesquisa de antígeno do pneumococo na urina apresenta maior sensibilidade. Contudo, estão descritas variações da especificidade, dependendo do padrão de comparação, da forma de execução e interpretação e da população-alvo. (Nolte 2008)

Métodos moleculares de diagnóstico

Vários investigadores desenvolveram testes PCR para a detecção de *Streptococcus pneumoniae* em amostras respiratórias, com variados graus de sucesso (Abdeldaim, Stralin e Olcen 2008). Duas grandes preocupações pautam a aplicação desta técnica: a presença de genes-alvo no grupo de *Streptococcus viridans* e a colonização assintomática.

Uma grande variedade de genes-alvo tem sido usada na PCR, incluindo o *lytA*, *ply*, *psaA* e o fragmento *Spn9802* (Abdeldaim, Stralin e Olcen 2008) (Carvalho, Tondella e McCaustland 2007). Actualmente, é reconhecido que todos estes genes, excepto o *ply* são encontrados exclusivamente no *Streptococcus pneumoniae* (Nolte 2008).

O uso de métodos *real-time* PCR visa a resolução da segunda preocupação. Neste método, a quantidade de ácido nucleico na amostra está inversamente relacionada com o valor limite do ciclo. Esta relação pode ser usada para estabelecer um valor de *cutoff*, que fornece sensibilidade e especificidade óptimas através de prevenção de resultados falsos-positivos, pela colonização por pequeno número de *Streptococcus pneumoniae*.

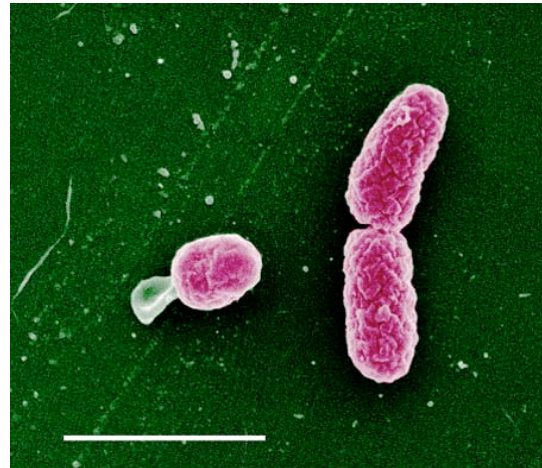
Yang *et al.* reportaram uma sensibilidade e especificidade de 90% e 80%, respectivamente, para um teste *real-time* PCR quantitativo para o gene *ply* – comparado com a referência *standard*, composta por coloração Gram de amostras de expectoração e culturas de expectoração e sangue. A presença do gene *ply* em *Streptococcus* do grupo *viridans* pode explicar a relativa baixa especificidade deste ensaio. (Yang, Lin e Khalil 2005)

Um grupo de investigadores usou a RT-PCR para amplificar genes de *Streptococcus pneumoniae*, no sentido de o distinguir de bactérias comensais da cavidade oral. Apesar de não ter sido possível uma distinção inequívoca, demonstraram existir uma tendência para um perfil genético particular, em indivíduos doentes. Um outro grupo desenhou um teste *real-time* PCR para o gene da pneumolisina para identificação do *Streptococcus pneumoniae* como

causa de empiema em crianças. Este teste identificou *Streptococcus pneumoniae* em 75% das amostras de líquido pleural, comparativamente com 33% identificadas por cultura (Chan e Morris 2007).

Morozumi *et al.* usaram um painel de seis testes *real-time* PCR para analisar 429 amostras clínicas de crianças e adultos com pneumonia. Usaram como alvos o gene *lytA* do *Streptococcus pneumoniae*, o gene *mip* da *Legionella pneumophila* e os genes *16S rRNA* do *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*. O tempo de análise foi de cerca de duas horas. A sensibilidade e especificidade comparadas com culturas convencionais foram as seguintes: 96,2% e 93,2% para *Streptococcus pneumoniae*; 95,8% e 95,4% para *Haemophilus influenzae*; 100% e 100% para *Streptococcus pyogenes*; e 100% e 95,4% para *Mycoplasma pneumoniae*, respectivamente. Adicionalmente, identificaram uma excelente correlação entre os resultados semi-quantitativos da cultura e o valor limite do ciclo nos testes PCR para *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*. Todos os indivíduos com PCR positiva e cultura negativa para estes dois microrganismos possuíam uma história prévia de antibioterapia (Morozumi, Nakayana e Iwata 2006).

Haemophilus influenzae



Existem dados limitados quanto ao uso de NAATs para identificação de *Haemophilus influenzae* em infecções respiratórias. A PCR tem mostrado sensibilidade e especificidade razoáveis em amostras de sangue de crianças com doença invasiva, incluindo pneumonia. (D. Murdoch, 2004)

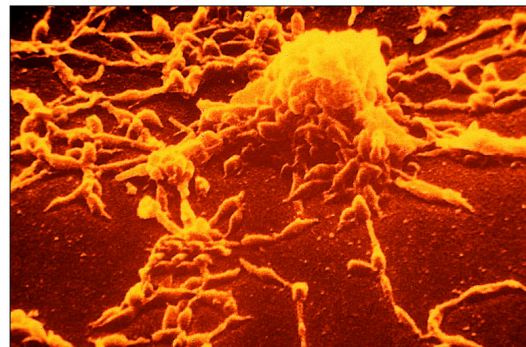
Os dados encontrados na pesquisa bibliográfica referem apenas detecção deste agente incluído em painéis *multiplex*.

Como descrito anteriormente, Morozumi *et al.* usaram um painel de seis análises *real-time* PCR em amostras respiratórias de crianças e adultos com pneumonia. Estas possuíam como alvo genes de vários agentes, incluindo o gene *16S rRNA* do *Haemophilus influenzae*. O tempo de análise foi de cerca de duas horas, apresentando sensibilidade e especificidade de 95,8% e 95,4%. (Morozumi, Nakayana e Iwata 2006)

Stralin *et al.* compararam métodos de cultura com PCR *multiplex* para detecção de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*. Analisaram amostras nasofaríngeas e de expectoração de adultos com PAC, obtendo sensibilidade entre 58 e 100%, e especificidade entre 42 e 100%, dependendo do microrganismo e do tipo de amostra. (Stralin, Tornquist e Kaltoff 2006)

O teste *ResPlex I* (Qiagen) foi desenvolvido em cooperação pelo CDC e a Genaco Biomedical Products, Inc. Este foi desenhado para amplificação e detecção de sequências de DNA específicas de genes de seis bactérias patogênicas respiratórias: *Streptococcus pneumoniae* (*lytA*), *Neisseria meningitidis* (*ctrA*), *Haemophilus influenzae* encapsulado e não-encapsulado (*bexA*, *ompP2*), *Legionella pneumophila* (*mip*), *Mycoplasma pneumoniae* (*ATPase*) e *Chlamydia pneumoniae* (*ompA*). Apresenta elevada especificidade, no entanto, menor sensibilidade que a técnica *real-time* PCR. (Chan e Morris 2007)

Mycoplasma pneumoniae



O *Mycoplasma pneumoniae* é uma das maiores causas de infecção das vias respiratórias inferior em crianças.

É responsável por cerca de 15 a 20% de todos os casos de PAC, estando também associado a exacerbações de asma. (Waites e Talkington 2004) (Daxboeck, Krause e Wenisch 2003)

A sua identificação é importante para o estabelecimento de tratamento apropriado, visto os antibióticos β -lactâmicos, usados frequentemente como terapêutica empírica de pneumonia, serem ineficazes nesta infecção.

Os métodos de cultura são demorados e pouco sensíveis. O *Mycoplasma pneumoniae* cresce lentamente *in vitro*, necessitando em média 2 a 5 semanas para o aparecimento de colónias. A cultura é positiva em apenas 30 a 60% dos casos diagnosticados serologicamente. (Loens, Ursi e Goosens 2003) (Kashyap, Kumar e Sethi 2008)

A detecção de anticorpos em amostras seriadas é ainda considerada o *gold standard* de diagnóstico do *Mycoplasma pneumoniae* (Kashyap, Kumar e Sethi 2008). Estes testes são de fácil execução, no entanto, são pouco específicos e retrospectivos.

Métodos moleculares de diagnóstico

As NAATs são mais rápidas, sensíveis e específicas, quando comparados com métodos tradicionais de cultura e serológicos.

Kashyap *et al.* compararam PCR, métodos de cultura e serológicos para a identificação de *Mycoplasma pneumoniae* em 75 crianças com PAC. O *Mycoplasma pneumoniae* foi identificado por cultura em 5,33%, e por serologia em 21,3%. A PCR foi positiva em 17,3% das amostras. Concluíram que a combinação dos três métodos é mais útil, que qualquer um dos métodos isoladamente (Kashyap, Kumar e Sethi 2008).

Martínez *et al.* realizaram um estudo prospectivo comparando um teste de imunofluorescência indirecta e PCR do gene *16S rRNA* para o diagnóstico de pneumonia por *Mycoplasma pneumoniae*, em 357 adultos com PAC. A PCR demonstrou ser positiva em 71,9% dos casos e a serologia em 84,4%. A menor sensibilidade da PCR levou-os a recomendar o uso em paralelo de ambos os métodos para confirmação do diagnóstico. Contudo, outros estudos afirmam que a PCR é uma boa alternativa aos métodos serológicos (Martínez, Ruiz e Zunino 2008).

NAATs tendo como alvo DNA não conseguem diferenciar entre microrganismos viáveis e não viáveis. Métodos de RT-PCR ou NASBA que recorre a detecção de RNA permitem colmatar esta falha.

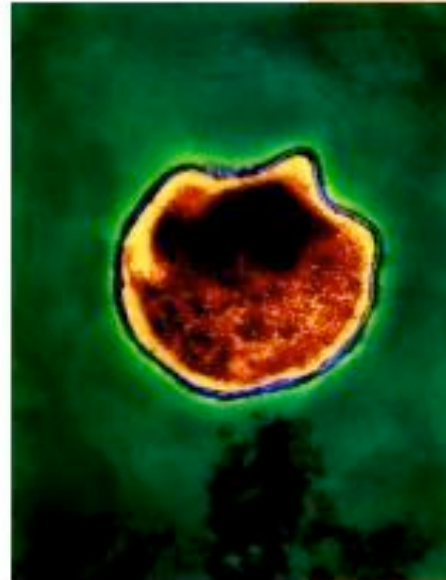
Morozumi *et al.* realizaram um estudo em larga escala, avaliando o uso da *real-time* PCR para a detecção de *Mycoplasma pneumoniae*, usando como alvo o gene do *16S rRNA*. A PCR detectou a quase totalidade de amostras positivas em cultura e serologia e detectou adicionalmente 20 casos em que a cultura se tinha mostrado negativa. Os resultados com o recurso à PCR estiveram disponíveis em cerca de duas horas, comparadas com as 2 semanas necessárias para a obtenção de resultados serológicos. Um teste *real-time* PCR tendo como alvo o gene *PI* da citadesina evidenciou piores resultados, com detecção de apenas 60% das infecções por *Mycoplasma pneumoniae*. (Chan e Morris 2007)

Múltiplos testes *multiplex* para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila* foram descritos (Morozumi, Nakayana e Iwata 2006) (Loens, Beck e Ursi 2008) (McDonough, Barrozo e Russell 2005) (Welti, Jatón e Altwegg 2003).

Actualmente, estão comercialmente disponíveis dois testes PCR *multiplex* para detecção de *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* (Pneumoplex; Prodesse) ou *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae* (Chamylege; Argene) (Chan e Morris 2007).

Carrillo *et al.* desenvolveram um estudo prospectivo para avaliar o desempenho de um *kit* de detecção por PCR, em amostras respiratórias de crianças, de 5 bactérias (Vircell SL kit), incluindo *Mycoplasma pneumoniae*. Obtiveram sensibilidade de 92,8% e especificidade de 100% (Carrillo, Gutierrez e Garcia 2009).

Chlamydia pneumoniae



A *Chlamydia pneumoniae* é responsável por cerca de 10% das PAC. (Carrillo, Gutierrez e Garcia 2009)

O seu isolamento em cultura é muito difícil, sendo que os conhecimentos sobre a sua epidemiologia foram apreendidos através de métodos serológicos.

Evidências serológicas sugerem que 50 a 60% dos adultos terão infecção por *Chlamydia pneumoniae* durante a sua vida, tornando-a um agente muito prevalente. Por este motivo, existe uma elevada prevalência de anticorpos específicos na população, sendo os resultados serológicos de difícil interpretação (McDonough, Barrozo e Russell 2005).

À semelhança de outros agentes respiratórios, as limitações das técnicas de diagnóstico convencionais estiveram na base da criação de métodos moleculares para diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae*.

Métodos moleculares de diagnóstico

Estudos de testes moleculares para o diagnóstico de *Chlamydia pneumoniae* apresentam, frequentemente, resultados contraditórios.

A evidência actual indica que a PCR é tão sensível como os métodos tradicionais de cultura; contudo, a sua especificidade não é conhecida.

O uso de técnicas de PCR altamente sensíveis aumenta a capacidade de detectar portadores assintomáticos, no entanto a sua relevância clínica não está estabelecida.

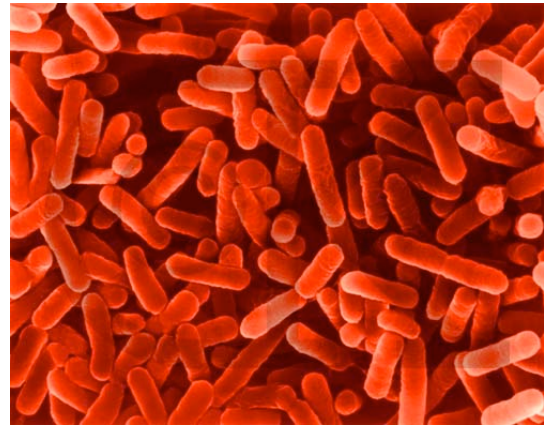
Para este agente, os resultados da PCR devem ser cautelosamente interpretados, enquadrando-os no contexto clínico e no resultado de outros testes de diagnóstico (D. Murdoch, Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections 2004).

Durante os últimos anos, vários testes PCR foram desenvolvidos e optimizados para a detecção de *Chlamydia pneumoniae*.

Existe um número limitado de testes *multiplex* que incluam a detecção deste agente, apesar das suas vantagens (Carrillo, Gutierrez e Garcia 2009).

Comercialmente, estão disponíveis os dois já atrás referidos: Pneumoplex (Prodesse) e Chamylege (Argene) (Chan e Morris 2007).

Legionella pneumophila



A *Legionella pneumophila* é uma bactéria oportunista, sendo uma causa comum de infecção em doentes com co-morbilidades.

Mais de 40 espécies pertencentes ao género *Legionella* foram identificadas, no entanto 90% dos casos confirmados por cultura são atribuíveis à *Legionella pneumophila*. (Yu, Plouffe e Pastoris 2002)

Esta é responsável por cerca de 2 a 9% de todas as PAC, (Marrie 2009) apresentando uma taxa de mortalidade que varia entre 5 e 30% (McDonough, Barrozo e Russell 2005).

É importante um diagnóstico definitivo em tempo útil. O atraso no início de tratamento adequado está associado a aumento da mortalidade (Heath, Grove e Looke 1996).

O diagnóstico é baseado em métodos fenotípicos (cultura, serológica e detecção do antígeno na urina) e genotípicos, como a PCR.

O isolamento em cultura de *Legionella* usando amostras respiratórias é considerado o *gold standard* em termos de definição, no entanto apresenta baixa sensibilidade (variando entre 10% e 80%); uma cultura positiva não está normalmente disponível em menos de 3 dias após incubação (D. Murdoch, 2003). O facto de pouco mais de metade dos doentes produzirem expectoração, limita o uso dos métodos de cultura (D. Murdoch, Diagnosis of Legionella infection 2003).

Os testes serológicos são uma ferramenta epidemiológica útil, no entanto com pouco impacto na decisão clínica, devido à demora na obtenção de resultados.

Para a detecção da *Legionella pneumophila* serogrupo 1, os testes de detecção do antigénio na urina possuem sensibilidade que varia entre 56 e 99% e especificidade rondando os 100%. Contudo, são incapazes de detectar outros serogrupos (Diederer, de Jong e Marmouk 2007).

Métodos moleculares de diagnóstico

Testes que fazem uso da PCR conseguem detectar DNA específico de *Legionella* em amostras respiratórias, com variados graus de sensibilidade e especificidade (Diederer, de Jong e Marmouk 2007) (D. Murdoch, Diagnosis of Legionella infection 2003). Neste tipo de amostras a PCR apresenta sensibilidade igual ou superior aos métodos de cultura. (D. Murdoch, Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections 2004)

A aplicação desta técnica a amostras não-respiratórias é particularmente atractiva, contornando o problema da não-produção de expectoração.

Num estudo, a PCR para detecção de *5S rRNA*, específico de *Legionella pneumophila*, em amostras de soro, foi positiva em 80,5% dos casos, com um pico de positividade entre o 6º e o 10º dia pós-infecção (Lindsay, Abraham e Findlay 2004).

Diederer *et al.* realizaram um estudo para testar o desempenho da PCR como método rápido de diagnóstico, em amostras de soro. Na fase aguda de doença, a detecção de DNA no soro pode ser uma ferramenta útil em adição aos testes de diagnóstico já existentes, com o potencial de detectar infecções causadas por qualquer espécie ou serogrupo. A forte associação entre o valor limite do ciclo e o valor de *Proteína C Reactiva* sugere que o uso de

PCR para detecção de *Legionella pneumophila* deve ser especialmente considerada em doentes com pneumonia severa de etiologia desconhecida. Concluíram que a melhor estratégia inicial para detecção de *Legionella pneumophila* consiste no teste de pesquisa do antigénio na urina combinado com a PCR em expectoração e soro (Diederer, de Jong e Marmouk 2007).

O *BD ProbeTec ET LP Amplified DNA Assay* (Becton Dickinson Biosciences) foi o primeiro teste comercial aprovado pela FDA para detecção directa de *Legionella pneumophila* em doentes com elevada suspeita clínica. Este ensaio detecta os serogrupos de 1 a 14, os mais frequentemente envolvidos na *Doença dos Legionários*.

Actualmente, a detecção de *Legionella* é possível com os testes *multiplex* anteriormente referido. (Chan e Morris 2007).

ENSAIOS SIMPLEX VERSUS MULTIPLEX

Brittain-Long *et al.* (2007) desenvolveram um estudo de avaliação da aplicabilidade de técnicas *real-time multiplex* em infecções respiratórias virais e bacterianas. Este teste permitiu a detecção, em amostras respiratórias, de *Vírus Influenza A e B*, *Vírus Parainfluenza* serótipos 1, 2 e 3, *Metapneumovírus humano*, *Vírus Sincicial Respiratório*, *Rinovírus*, *Enterovírus*, *Adenovírus*, *Coronavírus humano (229E, OC43 e NL63)*, *Mycoplasma pneumoniae* e *Chlamydia pneumoniae*. É de um teste de baixo custo e de grande utilidade clínica, permitindo a diferenciação entre pneumonias bacterianas e virais (Brittain-Long, Nord e Olofsson 2008).

Existem múltiplos testes *multiplex* para detecção das principais bactérias atípicas.

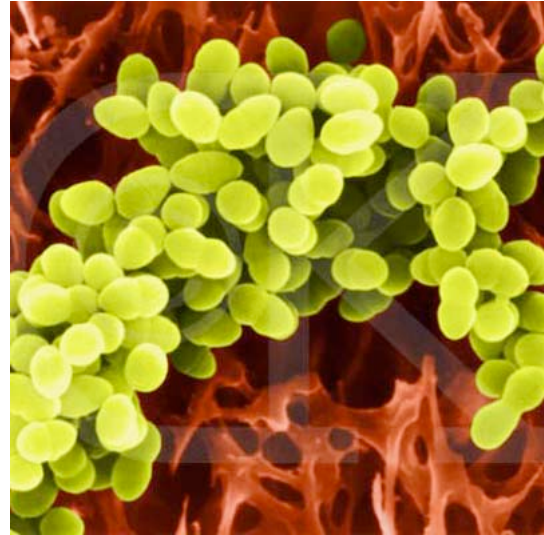
Loens *et al.* (2008) desenvolveram um estudo comparativo de sensibilidade e especificidade entre *real-time* NASBA *simplex* e *multiplex* e PCR *simplex*, em amostras respiratórias, para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* e *Legionella pneumophila*. Obtiveram sensibilidades de 77,8%, 100% e 100% para *Mycoplasma pneumoniae*; 50%, 100% e 50% para *Legionella pneumophila*, por PCR, *real-time* NASBA *simplex* e *multiplex*, respectivamente. A *real-time* NASBA *simplex* é mais sensível que a PCR *simplex*, sendo a *real-time* NASBA *multiplex* a menos sensível das três. Não foi possível tirar conclusões para *Chlamydia pneumoniae*, visto ter sido detectada em apenas duas amostras. Com este estudo, foi demonstrada a capacidade de execução de amplificação *multiplex*, no entanto o NASBA *multiplex*, na sua forma actual, apresenta baixa sensibilidade, necessitando de optimização (Loens, Beck e Ursi 2008).

McDonough *et al.* (2005) desenvolveram um estudo de PCR *multiplex* para a detecção das quatro principais bactérias atípicas causadoras de pneumonia: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Bordetella pertussis*. Este estudo evidenciou boa sensibilidade e especificidade de 100% para as quatro bactérias testadas. A sensibilidade deste teste PCR *multiplex* foi igual ou superior à sensibilidade verificada em estudos anteriores com PCR *simplex*, sem ocorrência de reacções cruzadas entre *primers* (McDonough, Barrozo e Russell 2005).

Métodos *real-time* quantitativos para bactérias atípicas oferecem uma alternativa atractiva. Fornecem resultados num intervalo de 4 a 5 horas através de métodos-padrão, sem necessidade de manipulação de produtos, diminuindo o risco de falsos-positivos. Adicionalmente, detectam múltiplos microrganismos simultaneamente em pequenos volumes de amostras. Uma grande vantagem é a possibilidade de quantificação de produtos de

amplificação, permitindo a distinção entre portadores assintomáticos saudáveis e indivíduos doentes (Welti, Jaton e Altwegg 2003).

Staphylococcus aureus



Nas infecções por *Staphylococcus aureus*, as técnicas moleculares têm sido usadas para fins epidemiológicos e de detecção de resistência a fármacos.

As técnicas mais frequentemente utilizadas para identificação de estirpes de *Staphylococcus aureus* são a *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) e *multilocus sequence genotyping*. Desenvolvimentos recentes, visando a otimização destas técnicas, combinaram estas técnicas com a PCR, de forma a permitir a distinção de estirpes (Strommenger, Kettlitz e Weniger 2006).

A resistência a fármacos é testada através da identificação do gene *mecA*, que codifica a *β -lactam-resistant penicilin-binding protein*. As técnicas moleculares têm ainda utilidade na distinção entre as estirpes adquiridas na comunidade e as nosocomiais. (Chan e Morris 2007)

O crescente número de microrganismos multirresistentes tem gerado preocupação na comunidade médica, particularmente o MRSA. A emergência e disseminação de MRSA está associada quer a infecções hospitalares, quer a infecções adquiridas na comunidade.

Hospitais e outras unidades prestadoras de cuidados de saúde enfrentam taxas alarmantes de infecção por este agente. Perante isto, são necessárias estratégias eficientes para o controlo de infecção, nomeadamente a identificação precoce de MRSA em doentes hospitalizados, de forma a prevenir a sua disseminação e o estabelecimento pronto de medidas de isolamento.

Por este motivo, resultados laboratoriais céleres são de extrema importância. Contudo, os métodos convencionais requerem tempos prolongados de incubação e testes confirmatórios.

Testes moleculares de diagnóstico

A introdução de vários testes rápidos para identificação de portadores de MRSA foi um importante passo para o controlo desta infecção.

O primeiro ensaio molecular desenvolvido foi baseado na detecção de uma sequência específica do *Staphylococcus aureus* e no gene *mecA*, que codifica a resistência à meticilina.

Estes testes são de difícil uso na detecção de MRSA em amostras não estéreis, como amostras nasais, devido à co-presença de *Staphylococcus aureus* meticilino-sensíveis (MSSA) e *Staphylococcus* coagulase negativos meticilino-resistentes, resultando num grande número de falsos-positivos. Esta limitação técnica tem sido ultrapassada associando a detecção do gene *mecA*, com a detecção do gene *orfX*, cromossomicamente próximo (von Eiff, Maas e Sander 2008).

Apesar dos recentes avanços nos testes moleculares, os elevados custos e a necessidade de técnicos especializados permanecem como obstáculos à sua disseminação na prática clínica.

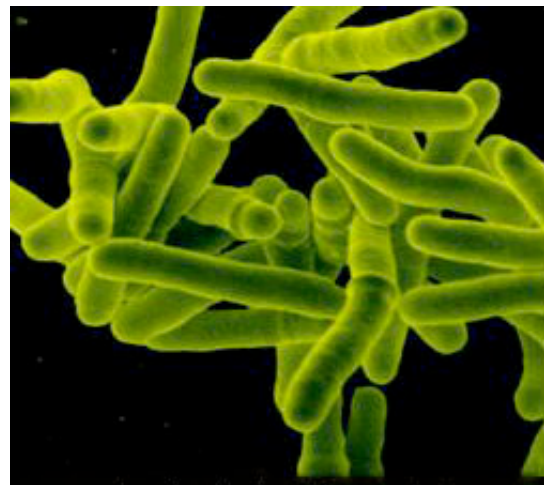
Em 2006, foi introduzido um método rápido para detecção directa de MRSA baseado numa nova técnica de bioluminescência. Uma versão melhorada deste método, o teste *3MTM BacLiteTM Rapid MRSA* (3M Company, MapleWood, MN, EUA) foi recentemente introduzido, o que permite determinar a presença de MRSA em cerca de 5 horas. Apesar do seu desempenho clínico ter sido analisado, não existiam dados sobre a detecção de espécies de MRSA com elevada diversidade genética (von Eiff, Maas e Sander 2008).

Von Eiff *et al.* (2008) desenvolveram um estudo para determinar a fidelidade na detecção de estirpes de MRSA, actualmente em circulação na Alemanha e noutras partes da Europa, com base em várias colecções de estirpes de MRSA bem caracterizadas. Para esse fim, mais de 700 estirpes de MSSA e MRSA foram usadas. Todas as estirpes de MRSA foram reconhecidas como meticilino-resistentes. Nenhuma das estirpes meticilino-sensíveis foi detectada como positiva. Concluíram que este teste detecta sem excepção todas as estirpes de MRSA, incluindo estirpes com elevada diversidade genética, inferindo o seu potencial para detectar estirpes emergentes.

Em 2003, Huletsky *et al.*, desenvolveram um teste *real-time PCR multiplex* capaz de detectar MRSA em amostras não-estéreis, em menos de 1 hora. Contrariamente a todos os estudos publicados até essa data, este teste não requer qualquer isolamento prévio, captura ou enriquecimento das bactérias, com obtenção de resultados num curto espaço de tempo (Huletsky, Giroux e Rossbach, New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci 2004).

Em 2005, Huletsky *et al.* desenvolveram um teste *real-time* PCR com recurso a técnicas de fluorescência que permite a detecção de MRSA em amostras contendo misturas de *Staphylococcus*, por recurso a *primers* e sondas específicas. Concluíram que este é um método rápido e eficaz para a detecção de MRSA em amostras clínicas, com elevada especificidade e sensibilidade (Huletsky, Rossbach e Gagnon, 2005).

Mycobacterium tuberculosis



O sucesso evolutivo do *Mycobacterium tuberculosis* reflecte-se na sua coexistência com os humanos há mais de 2 milénios. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reportou mais de 9 milhões de novos casos e 1,7 milhões de mortes em 2006. O impacto económico desta doença é profundo. Visto tratar-se de uma doença crónica, com longo período de potencial transmissão, a melhoria das técnicas de diagnóstico é de extrema importância (Nyendak, Lewinsohn e Lewinsohn 2009).

Durante a última década, verificou-se uma melhoria drástica nos testes de detecção de *Mycobacterium tuberculosis*.

Os avanços na sua detecção incluem a microscopia de emissão de luz fluorescente, NAATs e cultura em meio líquido, complementados com testes de susceptibilidade aos

antibióticos. Na detecção da infecção latente, as técnicas de libertação de *interferão- γ* (*IFN γ*) oferecem melhores resultados que o teste de intradermo-reacção.

Avanços na microscopia

O exame directo recorrendo à coloração com carbofucsina (método de *Ziehl-Neelsen*) ou auramina-rodamina fluorescentes permanece como o principal método de diagnóstico, sendo largamente recomendado pela OMS.

Uma recente meta-análise mostrou que a microscopia de fluorescência aumenta em cerca de 10% a sensibilidade de detecção em amostras de expectoração, comparativamente com exame directo (Steingart e Henry 2006).

Avanços em métodos de cultura

A cultura permanece como o *gold-standard* para a detecção e realização de testes de sensibilidade a fármacos.

A cultura tradicional em meio de *Lowenstein-Jensen* pode demorar entre 4 a 6 semanas. Sistemas de cultura em meio líquido (BACTEC e MGIT, BD Diagnostics, Sparks, Maryland, EUA) oferecem uma alternativa mais rápida e com maior sensibilidade, podendo evidenciar crescimento em 1 a 3 semanas (Dinnes, Deeks e Kunst 2007).

O *tubo indicador de crescimento micobacteriano* (MGIT) contém uma substância fluorescente no fundo do tubo, inibida pelo oxigénio. À medida que ocorre crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*, o oxigénio no tubo é usado e a substância fluorescente é detectada. Potencialmente, esta tecnologia é capaz de fornecer resultados em menos de 8 dias. A MGIT automatizada permite o teste de susceptibilidade a fármacos, através da adição de

concentrações críticas de Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina e Etambutol (Nyendak, Lewinsohn e Lewinsohn 2009).

Avanços na amplificação de ácidos nucleicos

As NAATs são uma ferramenta molecular importante, rápida e sub-utilizada para diagnóstico de tuberculose.

Estes testes detectam micobactérias com elevada especificidade através da amplificação de sequências de ácidos nucleicos específicas.

O CDC recomenda a execução de uma NAAT na primeira amostra de expectoração de todos os indivíduos com suspeita de infecção tuberculosa, independentemente do resultado do exame directo (Nyendak, Lewinsohn e Lewinsohn 2009).

As NAATs comercialmente disponíveis incluem os métodos já aprovados pela FDA para uso em doença pulmonar com exame directo positivo: *Gen-Probe Amplified Mtb Direct test* (Gen-Probe Inc., San Diego, Califórnia, EUA) e o *Roche Amplicor Mtb test* (Roche Molecular Systems, Branchburg, New Jersey). Actualmente, já se encontra disponível um teste de segunda geração da *Gen-Probe*, também aprovado pela FDA, para amostras negativas ao exame directo.

Outros *kits* comerciais estão disponíveis e incluem a versão automatizada da Roche, *COBAS Amplicor* (Roche Diagnostics Systems, Mannheim, Alemanha) e o *BD-ProbeTec Direct (SDA)* (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, Maryland, EUA). Em amostras com exame directo positivo, a sensibilidade é de 96%. A sensibilidade em amostras negativas ao exame directo varia entre 66 e 72%.

Na prática clínica, as NAATs usadas em casos de elevada suspeição clínica de tuberculose aumentaram a sensibilidade estimada. Um estudo multicêntrico reportou

sensibilidades de 83%, 75% e 87% para amostras com baixa, média e alta suspeição clínica, respectivamente.

Ling *et al.* (2008) realizaram uma meta-análise, analisando mais de 125 estudos. Reportaram sensibilidade e especificidade de 85% e 97%, respectivamente. Contudo, esta realça a grande heterogeneidade dos estudos, através da grande variabilidade de sensibilidade (36% a 100%) e especificidade (54% a 100%).

Para obviar a necessidade de laboratórios de referência, foram desenvolvidos métodos simples e de baixo custo.

A *Loop-mediated Isothermal Amplification* (LAMP) do grupo Eiken é uma NAAT rápida que não necessita de termociclador ou de refrigeração de reagentes. Este sistema de amplificação isotérmica utiliza múltiplos *primers* para aumentar a especificidade. Esta abordagem demonstrou possuir uma sensibilidade de 97% a 100%, em amostras positivas ao exame directo e cultura. Contudo, a sensibilidade em amostras negativas ao exame directo e positivas em cultura, é de apenas 49%; apresenta especificidade de 99% (Nyendak, Lewinsohn e Lewinsohn 2009).

Avanços na detecção de resistência a fármacos

Provavelmente um dos maiores avanços no diagnóstico de tuberculose é o rápido teste de sensibilidade a fármacos, dada a crescente prevalência e impacto de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes. Este é definido como resistente a dois agentes de primeira linha, Rifampicina e Isoniazida.

O ensaio de observação microscópica de susceptibilidade a fármacos (MODS) é uma alternativa de baixo custo para a detecção de resistência a fármacos, que usa a microscopia de luz invertida. Na Etiópia, esta técnica foi usada para detecção de *Mycobacterium tuberculosis*

multirresistentes, com uma sensibilidade e uma especificidade de 95% e 100%, respectivamente. O tempo de detecção é de 7 dias, similar ao MGIT. Um estudo extenso no Perú reportou sensibilidade de 97,8% (Ejigu e Woldeamanuel 2008).

Foram desenvolvidos diversas NAATs que detectam *Mycobacterium tuberculosis* e simultaneamente amplificam regiões que conferem a resistência aos fármacos, como o ensaio *Line probe* (LiPAs), *INNO-LiPARif.TB* (Innogenetics, Ghent, Belgium) e *GenoTypeMTBDR* (Hain LifeScience, Nehren, Germany). Os dois últimos estão disponíveis comercialmente.

O *INNO-LiPARif.TB* detecta simultaneamente o *Mycobacterium tuberculosis* e a sua resistência à Rifampicina. Morgan *et al.* fizeram uma revisão de 15 estudos, reportando sensibilidade variável entre 82% e 100% e especificidade entre 92% e 100% para este teste. (Morgan, Kalantri e Flores 2005).

O ensaio *GenoTypeMTBDRplus* detecta resistência a Rifampicina e Isoniazida. Ling *et al.* reportaram uma sensibilidade e uma especificidade de 98,4% e 98,9%, respectivamente, para a resistência à Rifampicina. Em contraste, demonstraram haver maior heterogeneidade nos resultados encontrados para a resistência à Isoniazida, com sensibilidade e especificidade de 88,7% e 99,2%, respectivamente. (Ling, Zwerling e Pai 2008) Barnard *et al.* executaram um estudo semelhante na região de Cape Town na África do Sul, altamente endêmica, tendo reportado sensibilidades e especificidades (Rifampicina/Isoniazida) de 98%/94% e 99%/99%, respectivamente (Barnard, Albert e Coetzee 2008).

Existe uma grande esperança nestes métodos. Continuam os estudos no sentido de aplicar esta tecnologia a regiões com elevadas taxas de tuberculose.

Marcadores moleculares são um método alternativo para detecção rápida de resistência a fármacos. Estes indicadores colorimétricos são atractivos devido à facilidade de interpretação de resultados.

Foram descritos testes com marcadores moleculares de resistência à Rifampicina e Isoniazida, em amostras de expectoração e isolados de culturas. Lin *et al.* reportaram sensibilidade e especificidade para detecção de resistência à Rifampicina de 97% e 100% e de 82 e 100% para a Isoniazida, respectivamente. Os marcadores moleculares estão actualmente em estudo, não tendo sido ainda aprovados pela FDA (Nyendak, Lewinsohn e Lewinsohn 2009).

Esta tecnologia está a ser amplamente desenvolvida pela Cepheid Inc. (Sunnyvale, California, EUA), usando um *kit*, *Xpert MTB*, num teste *real-time* PCR automatizado. É executado em amostras de expectoração, para detecção de resistência à Rifampicina.

A tecnologia de *microarrays* é uma área promissora para o estudo de resistência a fármacos, sendo actualmente condicionada pelos elevados custos económicos.

Avanços na detecção de tuberculose latente

É estimado que cerca de metade dos casos de tuberculose resultem da reactivação de infecção latente. A detecção e tratamento de infecção latente permanecem uma prioridade em termos de saúde pública.

Até recentemente, a detecção de infecção latente era efectuada pelo teste de intradermo-reacção. Apesar de ter demonstrado ser útil na detecção e tratamento de infecção latente, existem dificuldades na leitura e interpretação dos resultados, além da diminuição da especificidade em indivíduos vacinados (BCG).

Perante isto, testes sanguíneos baseados em respostas imunes a antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis*, *ESAT-6* e *CFP-10*, ausentes em outras micobactérias e no *Bacilo de Calmette–Guérin* (BCG), são de particular interesse. Estes ensaios assentam na detecção de *IFN γ* libertado pelas células T sensibilizadas (na maioria células T CD4), em

resposta a estes antígenos. São colectivamente designados de *interferon γ release assays* (IGRAs) (Nyendak, Lewinsohn e Lewinsohn 2009).

Actualmente, existem duas plataformas comercialmente disponíveis e aprovadas pela FDA, o *Quantiferon In-Tube* (Cellestis, Melbourne, Victoria, Austrália) e o *T-SPOT.TB* (Oxford Immunotech, Oxford, UK).

Uma meta-análise recente, por Pai *et al.* reportou uma especificidade para *QFT-Gold* (ensaio de segunda geração) de 99%, *QFT-IT* de 96% e *T-SPOT* de 93% e sensibilidades de 81,4% e 92,6% e 90%, respectivamente. Estudos comparando *T-SPOT.TB* e *QFT-Gold* sugerem que o *T-SPOT.TB* apresenta melhor sensibilidade (Pai, Zwerling e Menzies 2008).

À semelhança da intradermo-reacção, um IGRA negativo não exclui a hipótese de tuberculose, devendo ser visto como um adjuvante e não substituto da avaliação clínica dos doentes suspeitos de infecção tuberculosa.

Visto os IGRAs, à semelhança da intradermo-reacção, reflectirem a resposta do hospedeiro à infecção, é importante realçar variações biológicas de resposta imune e a inerente variabilidade na determinação do IFN γ . Uma variabilidade de 15% é aceite pela FDA. Por essa razão, é importante que sejam fornecidas aos clínicos informações quantitativas do ensaio, de forma a permitir uma correcta interpretação de resultados.

Apesar de não existir um *gold standard*, em vários estudos, quando marcadores acessórios de exposição recente ao *Mycobacterium tuberculosis* estão presentes, os IGRAs têm demonstrado ser tão bons ou melhores que a intradermo-reacção na detecção de infecção latente (Nyendak, Lewinsohn e Lewinsohn 2009).

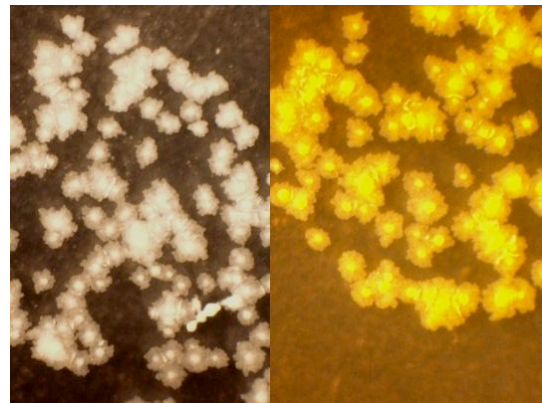
A conjugação destes dados com as características de desempenho dos IGRAs levou o CDC a recomendar o uso destes testes em todas as situações em que a intradermo-reacção é usada, no entanto acautelando o uso em imunodeprimidos e crianças.

Os resultados ainda não são claros, mas dados recentes sugerem que um IGRA positivo pode ser preditivo de futura progressão para doença.

Biomarcadores

Estão em estudo métodos de diagnóstico serológico usando anticorpos específicos do *Mycobacterium tuberculosis* para detecção da doença.

As áreas de investigação activa incluem: novos anticorpos com potencial utilidade, a *CXC chemokine IP-10* (proteína induzível por *IFN γ*), *T cell antigen Mtb heparin-binding hemeagglutinin*, o renovado interesse na intradermo-reacção usando antígenos selectivos para *Mycobacterium tuberculosis* (*ESAT-6*) e o uso de novos subtipos de células T e de perfis citoquímicos, assim como a detecção de produtos de *Mycobacterium tuberculosis* na urina (Nyendak, Lewinsohn e Lewinsohn 2009).



Micobactérias não-tuberculosas

As infecções pulmonares causadas por micobactérias não-tuberculosas têm sido diagnosticadas em número crescente. Isto deve-se ao aumento de população em risco e ao melhoramento do conhecimento e da capacidade diagnóstica.

O número de espécies de micobactérias identificadas duplicou nos últimos 10 anos, devido principalmente ao aumento da sensibilidade das técnicas moleculares.

Em países industrializados, onde a taxa de tuberculose tem diminuído ou estabilizado, o número de infecções pulmonares por micobactérias não-tuberculosas excede, actualmente, o de tuberculose. Analogamente, estudos recentes em países africanos com elevada prevalência de HIV, indicam que as micobactérias não-tuberculosas podem ter um papel muito maior em doenças *tuberculose-like* do que previamente era suposto.

A sensibilidade das colorações ácido-álcool-resistentes depende da concentração de micobactérias. As colorações fluorocrómicas (auramina-rodamina) são os métodos preferidos, devido à sua sensibilidade.

Está recomendada a cultura em meio sólido e líquido, o primeiro permitindo uma identificação mais precisa e o segundo resultados mais rápidos.

A intradermo-reação tem um valor limitado, devido à presença de reações cruzadas e à falta de critérios validados para a interpretação destes testes.

O potencial dos IGRAs para diferenciar entre tuberculose e infecção por micobactérias não-tuberculosas é discutível. Estes testes não conseguem diferenciar entre infecção tuberculosa activa e latente e como tal, um resultado positivo pode reflectir tuberculose latente num doente verdadeiramente com doença pulmonar por micobactérias não-tuberculosas.

Finalmente, os antígenos incluídos nos IGRAs estão também presentes no *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium szulgai*, que podem resultar em respostas falsas-positivas (Arend, Soolingen e Ottenhoff 2009).

Estão em desenvolvimento técnicas moleculares com sondas genéticas e PCR, não havendo ainda dados disponíveis.

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO EM DOENTES COM ANTIBIOTERAPIA PRÉVIA

A antibioterapia prévia é um dos factores mais importantes para a redução da efectividade diagnóstica das culturas bacterianas.

Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos como *target-enriched PCR multiplex* (TEM-PCR), que não dependem da viabilidade dos microrganismos são provavelmente menos afectadas pela antibioterapia prévia, aumentando a sensibilidade diagnóstica.

Num estudo realizado por *Deng et al.* (2009), recorrendo a aspirados traqueais de crianças hospitalizadas por PAC, previamente tratadas com antibioterapia em ambulatório (penicilinas, cefalosporinas e macrólidos), a TEM-PCR mostrou ser mais sensível que a cultura na detecção de *Streptococcus pneumoniae*. Apresentou sensibilidade de 100% quando utilizados os métodos de cultura como referência padrão. De acordo com este facto, a PCR mostrou-se mais sensível que a cultura para a detecção de *Streptococcus pneumoniae*, em doentes com antibioterapia prévia. No que diz respeito ao *Haemophilus influenzae*, ainda que a taxa de detecção seja maior por TEM-PCR, a diferença observada não foi estatisticamente significativa.

Não obstante, esta técnica não permite a distinção entre colonização e infecção, quando usadas amostras respiratórias superiores (Deng, Zheng e Zhao 2009).

VÍRUS

INTRODUÇÃO

Estima-se que cerca de 80 % das infecções respiratórias agudas são de etiologia viral.

Estas são a principal causa de hospitalização de crianças em países desenvolvidos e a maior causa de morte em países em desenvolvimento (J. B. Mahony 2008).

Na prática clínica, o diagnóstico etiológico não é estabelecido numa percentagem considerável de casos, devido à carência de testes de diagnóstico sensíveis ou pela presença de agentes ainda não conhecidos.

A maioria das infecções respiratórias agudas de etiologia viral é devida aos seguintes vírus: *Influenza A e B*, *Parainfluenza tipo 1,2 e 3*, *Vírus Sincicial Respiratório (VSR)*, *Adenovírus* e *Rinovírus*.

Outros vírus como *Coronavírus*, *Bocavírus*, *Enterovírus*, *Parainfluenza tipo 4* e os recentemente descobertos *Parvovírus tipo 4 e 5* e *Mimivírus* são também responsáveis por infecções do tracto respiratório, no entanto são isolados com muito menor frequência.

A importância clínica do *Bocavírus*, *Parvovirus tipo 4 e 5* e *Mimivírus* ainda não está esclarecida (J. B. Mahony 2008).

As infecções respiratórias virais apresentam clínica semelhante, independentemente do agente em causa. O diagnóstico etiológico não é possível apenas com recurso à clínica, sendo necessária a utilização de métodos laboratoriais.

Desde 2000, foram descobertos vários vírus respiratórios como *Vírus Influenza Aviário (H5N1, H7N7, H7N3)*, *HMPV*, *SARS-Coronavírus*, *Coronavírus humano NL63* e *HKU1*.

Durante os anos 90, o diagnóstico etiológico das infecções respiratórias virais desenvolveu-se com a adopção dos testes moleculares.

As NAATs surgiram nos anos 80 para detecção do HIV, mas foram rapidamente estendidas ao diagnóstico de vírus respiratórios.

Foi em 2003 com o aparecimento do SARS-*Coronavírus* que sobressaiu a importância das NAATs para diagnóstico etiológico de infecções virais.

Desde então as NAATs foram desenvolvidas, tendo actualmente aplicação para todos os vírus, incluindo os emergentes (J. B. Mahony 2008).

Estes vírus, além da capacidade de provocarem síndromes respiratórias agudas, partilham um período de incubação relativamente curto e um modo de transmissão interpessoal através de contacto directo com secreções nasofaríngeas ou por aerossolização (gotas).

O conhecimento epidemiológico sobre infecções respiratórias virais tem sido alargado, quer pela descoberta de novos vírus, quer pelo desenvolvimento de testes moleculares mais sensíveis.

Testes de diagnóstico tradicionais

Nas últimas duas décadas, os métodos de cultura e serológicos têm sido o principal meio de diagnóstico etiológico das infecções respiratórias virais.

Foi usada uma grande variedade de testes serológicos, incluindo inibição da hemaglutinação, fixação de complemento e imunoensaio enzimático, durante a fase aguda e de convalescença da doença, para o diagnóstico de infecção. A inibição por hemaglutinação permite ainda a distinção entre os subtipos *H1* e *H3* do *Vírus Influenza* (J. B. Mahony 2008).

Com os métodos de cultura tradicionais são geralmente necessários 10 dias para a obtenção de resultados. A cultura tradicional em tubo foi substituída pela *shell vial culture* (SVC), que juntamente com anticorpos monoclonais específicos permite a detecção de antígenos virais em 1 a 2 dias.

A técnica de *direct fluorescent antibody* (DFA) aplicada a amostras nasofaríngeas, tornou-se uma forma rápida de diagnóstico, com resultados em cerca de 3 horas.

Os ensaios enzimáticos foram também desenvolvidos para diagnóstico etiológico de infecções respiratórias, mas a sua baixa sensibilidade relegou-os para situações muito particulares.

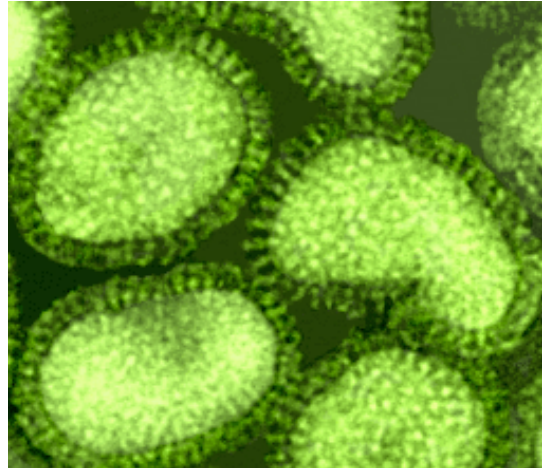
Testes de diagnóstico molecular

Foram desenvolvidas NAATs, incluindo a PCR, NASBA e LAMP para a maioria dos vírus respiratórios.

Devido à sua elevada sensibilidade estão actualmente a ser introduzidas na rotina laboratorial.

A PCR *multiplex* associada a tecnologia de *microarrays*, representa a mais recente abordagem diagnóstica laboratorial das infecções respiratórias virais.

Vírus Influenza



A infecção pelo vírus *Influenza* é uma das infecções virais mais prevalentes.

É um vírus de RNA de cadeia simples, de sentido negativo, pertencente à família dos Orthomyxoviridae. Os vírus *Influenza A*, *B* e *C* são os únicos membros desta família que produzem doença humana significativa. Possuem um genoma de RNA segmentado, que facilita o desenvolvimento de novas estirpes, a partir de mutação e rearranjos entre estirpes humanas e animais do vírus. Esta instabilidade genética é responsável pelas epidemias anuais e pandemias periódicas da infecção por vírus *Influenza* em todo o mundo.

O invólucro possui duas glicoproteínas: Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA). É revestido internamente pelas proteínas da matriz (M1) e membrana (M2).

A HA é uma proteína de fixação e de fusão, estimulando a resposta dos anticorpos neutralizantes. As mutações da HA são responsáveis pelas pequenas alterações (desvio) que ocorrem a cada 2 a 3 anos, causando surtos locais de infecção. As grandes alterações antigénicas (deslocamento) resultam da combinação do genoma de diferentes estirpes, incluindo estirpes animais. Os deslocamentos ocorrem apenas nos vírus da *Influenza A*, sendo as diferentes HA designadas por H1, H2, etc. Estes ocorrem em média a cada 10 anos, sendo responsáveis pelas pandemias.

A glicoproteína NA tem actividade enzimática, clivando o ácido siálico nas glicoproteínas das células dos receptores, impedindo a agregação e facilitando a libertação dos vírus das células afectadas. A NA do vírus da *Influenza A* também sofre alterações antigénicas, e as diferenças produzidas são designadas N1, N2, etc.

As proteínas M1, M2, NP são tipo-específicas e portanto são utilizadas para diferenciar os vírus *Influenza A* e *B*. A proteína M1 promove organização e a M2 forma canais de protões, sendo ambas alvos terapêuticos.

Não é possível a distinção clínica entre a infecção por vírus *Influenza A* ou *B*.

Trata-se de uma infecção habitualmente autolimitada, com período de incubação que varia entre um a quatro dias, com um período infeccioso em média de sete dias. A doença persiste por cerca de três dias e a recuperação é completa a menos que ocorra alguma complicação.

As consequências da não identificação destes agentes, principalmente a nível hospitalar, podem ser catastróficas. A sua identificação é muito importante para implementação de medidas de controlo de infecção. Os agentes antivirais, inibidores dos canais M2, Amantadina e Rimantadina, e inibidores da NA, Oseltamivir e Zanamavir são eficazes apenas quando administrados nas primeiras 24h de infecção. Por esta razão a sua identificação laboratorial é de extrema importância.

Nas últimas duas décadas, diversas abordagens diagnósticas têm sido usadas para a identificação de infecção pelo vírus *Influenza*.

Testes serológicos, como a inibição da hemaglutinação eram usados para detectar a seroconversão durante infecção por vírus *Influenza* e distinguir os subtipos *H1* e *H3* do vírus *Influenza A*. Caíram em desuso devido à sua baixa sensibilidade.

Os métodos culturais são demorados, necessitando em média de 4 a 5 dias para obtenção de resultados, podendo nalguns casos ir até 10 a 14 dias (Leland e Ginocchio 2007). A SVC combinada com anticorpos monoclonais permite a identificação da maioria dos vírus em 18 a 48 horas. A desvantagem desta técnica prende-se com o facto de alguns vírus não se replicarem facilmente nas células usadas (células *R-Mix*). Nem a cultura, nem SVC conseguem identificar vírus inactivos.

A combinação de DFA com SVC aumenta o número de resultados positivos em cerca de 5 a 15%, quando comparado com a DFA executada isoladamente. Esta técnica tem sido largamente usada e desenvolvida nas últimas 2 décadas, e actualmente estão disponíveis comercialmente excelentes anticorpos monoclonais. Os testes de DFA demoram em média 2 a 3 horas para serem executados. Contudo, técnicas de DFA ou a combinação de DFA com SVC não são os métodos mais adequados para a detecção de infecções virais mistas. Estas são mais eficientemente detectadas por NAATs.

Os testes de DFA para o vírus *Influenza* apresentam uma sensibilidade de cerca de 70 a 100%, especificidade de 80 a 100%, valor preditivo positivo (VPP) de 85 a 94% e valor preditivo negativo (VPN) de 96 a 100%, comparativamente com os métodos de cultura (WHO 2005).

Nos últimos 10 anos têm sido desenvolvidos imunoensaios enzimáticos como forma de detecção do vírus *Influenza A e B*. Estes testes fornecem resultados num curto espaço de tempo, apresentando sensibilidade de 70 a 75%, significativamente inferior à dos métodos de cultura tradicionais, SVC e DFA. No entanto, apresentam elevada especificidade (90% a 95%). Devido à sua baixa sensibilidade, apresentam elevado número de resultados falsos-negativos, tendo por este facto caído em desuso. A sua utilização reserva-se para situações

muito particulares, devendo os seus resultados ser avaliados e monitorizados em cada estação, de forma a garantir a identificação das estirpes em circulação (J. B. Mahony 2008).

Métodos moleculares de diagnóstico

Os testes moleculares para o vírus *Influenza* incluem: RT-PCR, NASBA e LAMP.

Diversos testes de RT-PCR para o vírus *Influenza* têm sido descritos desde o primeiro ensaio por Zhang e Evans em 1991.

Vários genes-alvo têm sido usados para amplificação: genes da matriz, HA e da proteína NS. Todos estes alvos têm sequências únicas e conservadas, permitindo o seu uso em testes consensuais e específicos de subtipo (*H1* ou *H3*). São necessários alvos diferentes para a detecção do vírus *Influenza B*.

Foram descritos testes que detectam todos os subtipos de vírus *Influenza A*, usando genes conservados da matriz. Adicionalmente foram desenvolvidos testes que permitem a distinção entre os vírus *Influenza A*, *B* e *C*, e entre os seus subtipos, usando genes *HA* (Ellis, Fleming e Zambon 1997).

Análises *nested* PCR proporcionam aumento da sensibilidade em relação a não-*nested* PCR. Contudo, a *nested* PCR não é rotineiramente usada, devido ao incremento de trabalho de amplificação e ao risco de contaminação.

Os testes *real-time* RT-PCR para o vírus *Influenza* oferecem resultados com maior celeridade. Possuem sensibilidades equivalentes ou superiores quando comparadas com métodos de cultura.

Ensaio de RT-PCR otimizados são de uma forma geral mais sensíveis 5 a 10% que os métodos de cultura. O maior aumento da sensibilidade com a PCR quando comparada com

DFA, é observado em amostras com baixa carga viral. No entanto, o desempenho real da maioria dos testes moleculares ainda é desconhecido (Kuypers, Wright e Ferrenberg 2006).

Os ensaios NASBA e LAMP apresentam sensibilidade equivalente à dos métodos de cultura.

Ensaio RT-PCR *multiplex* para a detecção de vírus *Influenza* e outros vírus respiratórios têm recentemente vindo a ser desenvolvidos, possuindo maior sensibilidade que os métodos de cultura (Mahony, Chong e Merante 2007).

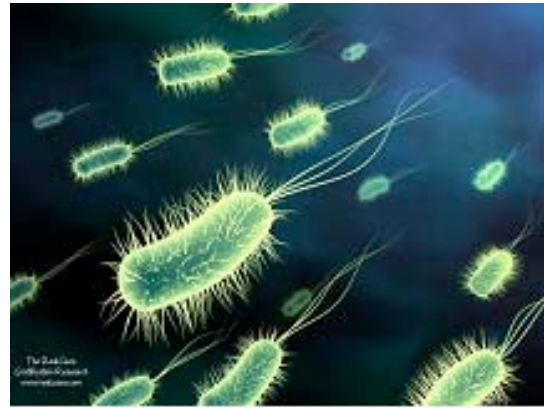
Primers e sondas específicas para vírus *Influenza A* e *B* estão disponíveis comercialmente, como o teste *GeneXpert Influenza A and B* da Cepheid (Sunnyvale, CA).

Vários ensaios *multiplex* comerciais para a detecção de vírus *Influenza* e outros vírus respiratórios estão disponíveis. Estes ensaios incluem *ResPlex II* (Quiagen), *MultiCode-PLx RVP* (EraGen Biosciences), *Seeplex RV* (Seegene Inc. Seoul, South Korea), *NGEN RVA ASR kit* (Nanogen Inc. San Diego, California), *xTAG RVP* (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada) (J. B. Mahony 2008).

Dois ensaios *multiplex* foram recentemente aprovados pela FDA: ensaio *ProFLu +* (Prodesse Inc), que detecta vírus *Influenza A*, *B* e *Vírus Sincicial Respiratório* e o ensaio *xTAG RVP*, aprovado para a detecção de 12 vírus respiratórios, sendo o primeiro aprovado para identificação de ambos os subtipos *H1* e *H3* do vírus *Influenza A*. Este último apresenta uma sensibilidade de 96,4% e uma especificidade de 95,9% para o vírus *Influenza A* e sensibilidade de 91,5% e especificidade de 96% para o vírus *Influenza B*, quando comparado com DFA e cultura (Center for devices and radiological health s.d.).

Em comparação com outras abordagens diagnósticas, as NAATs tem uma maior sensibilidade, seguidas de SVC, DFA, cultura em tubo e imunoensaios enzimáticos.

Vírus Parainfluenza



O vírus *Parainfluenza* foi descoberto no final da década de 1950. É responsável por cerca de 15 a 30% das doenças respiratórias não-bacterianas, que requerem hospitalização em crianças.

Pertence à família Paramyxoviridae e ao género *Paramixovírus*.

É constituído por um RNA de cadeia única de sentido negativo, associado à nucleoproteína (NP), fosfoproteína polimerase (P), e proteína grande (L), sendo esta última uma RNA polimerase. A proteína P facilita a síntese de RNA, enquanto a proteína NP ajuda a manter a estrutura genómica. O RNA encontra-se num nucleocapsídeo helicoidal, circundado por um invólucro, que contém uma proteína de fixação viral (HN) e uma glicoproteína de fusão (F). A proteína de fixação viral possui actividade de hemaglutinina e neuraminidase. A glicoproteína F promove a fusão das membranas celulares do vírus e do hospedeiro.

Quatro tipos serológicos pertencentes ao género *Parainfluenza* podem produzir infecção humana. Os tipos 1, 2 e 3 são causas de infecções nas vias aéreas inferiores. O vírus *Parainfluenza tipo 4* é menos comum, estando usualmente associado a infecção ligeiras das vias aéreas superiores.

O seu modo de transmissão e patogenia é semelhante ao vírus *Influenza*, no entanto a sua arquitectura genética não sofre desvios ou deslocamentos e raramente produz virémia.

O período de incubação varia de 1 a 7 dias, sendo o período infeccioso em média de 1 a 3 semanas. A doença aguda dura de 1 a 3 semanas, mas em média 7 a 10 dias (J. B. Mahony 2008).

Historicamente, o vírus *Parainfluenza* era isolado por detecção do antígeno viral ou RNA por DFA e NAATs, respectivamente, ou através de testes serológicos.

O SVC usando inoculação assistida por centrifugação em células *R-Mix*, com marcação dos antígenos virais é largamente usado a nível laboratorial.

Os antígenos virais são detectados rotineiramente em células epiteliais nasofaríngeas por DFA, usando um painel de anticorpos monoclonais. A sensibilidade de DFA em comparação com a cultura celular é variável entre 70% e 83% (Krunic, Yager e Himsworth 2007), dependendo dos reagentes usados. Foi recentemente comparada a sensibilidade de DFA com SVC, tendo sido demonstrado que a DFA tem sensibilidade de 70,5% e a SVC de 96,7%, para detecção de sete vírus respiratórios.

Combinações de anticorpos monoclonais marcados com dois corantes fluorescentes podem ser usadas para detectar vírus *Parainfluenza* tipo 1, 2 e 3 (*SimulFluor reagents*; Chemicon International, Temecula, CA). Estes reagentes foram aprovados pela FDA para teste directo das amostras e confirmação de cultura. Apresentam elevada sensibilidade e especificidade quando comparados com o uso de anticorpos individualmente (Landry e Ferguson 2000). O vírus *Parainfluenza* tipo 4 não é comumente detectado, visto não terem sido ainda aprovados anticorpos específicos para a sua detecção.

Métodos moleculares de diagnóstico

Uma grande variedade de NAATs para detecção do vírus *Parainfluenza* têm sido descritos, sendo que a maioria apresenta uma maior sensibilidade quando comparados com métodos de cultura.

Fan e Hendrickson descreveram o primeiro RT-PCR para vírus *Parainfluenza*, que se mostrou mais sensível que os métodos de cultura (Fan e Hendrickson 1996).

O gene *HA-NA* tem sido o alvo mais comum de amplificação, contendo regiões únicas para os quatro serótipos, permitindo o desenvolvimento de testes específicos para cada um destes (J. B. Mahony 2008).

Técnicas *nested* e *semi-nested* RT-PCR têm sido desenvolvidas, mas foram apenas avaliadas para algumas amostras positivas.

Técnicas RT-PCR *multiplex* para detecção dos 4 serótipos num único teste foram também desenvolvidos (Templeton, Scheltinga e Beersma 2004).

Templeton *et al.* descreveram um teste *multiplex* usado em 358 amostras. Evidenciou uma sensibilidade superior aos métodos de cultura. Infelizmente só possuíam 11 amostras positivas, pelo que não foi possível determinar sensibilidade e especificidade (Templeton, Scheltinga e Beersma 2004).

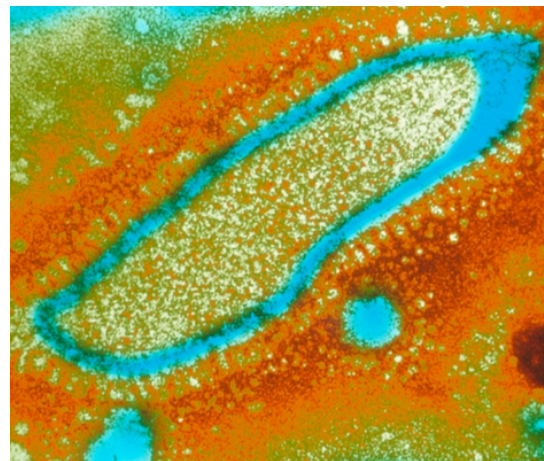
Bellau-Pujol *et al.* descreveram também um teste *multiplex* para detecção dos 4 serótipos, mas apenas detectaram 8 amostras positivas, não sendo possível determinar o desempenho do método usado (Bellau-Pujol, Vabret e Legrand 2005).

Kuypers *et al.* desenvolveram um teste *multiplex* usando como alvos genes da matriz e da polimerase. Avaliaram este ensaio usando 608 amostras, tendo-se mostrado mais sensível que DFA (Kuypers, Wright e Ferrenberg 2006).

Fan *et al.* avaliaram um teste *multiplex* comercial para detecção de vírus *Influenza A e B*, *Vírus Sincicial Respiratório A e B*, e vírus *Parainfluenza 1, 2 e 3* - Hexaplex (Prodesse, Milwaukee, WI). Este foi comparado com cultura e avaliado recorrendo a 363 amostras. Apenas 4 de 23 amostras positivas para Hexaplex foram confirmadas por cultura. Numa segunda avaliação envolvendo 109 amostras, este demonstrou ter sensibilidade semelhante à cultura. São necessárias mais avaliações para determinar seu o verdadeiro potencial (J. B. Mahony 2008).

Recentemente quatro testes *multiplex* para a detecção de vírus *Parainfluenza* e outros vírus respiratórios foram introduzidos: *ResPlex II* (Quiagen), *MultiCode-PLx RVP* (EraGen Biosciences), *Seeplex RV* (Seegene Inc. Seoul South Korea), *NGEN RVA ASR kit* (Nanogen Inc. San Diego, California), *xTAG RVP* (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada). Este último demonstrou sensibilidade de 100% para vírus *Parainfluenza tipo 1 e 2*; 84,2% para o *tipo 3* e especificidade superior a 99% para os 3 tipos (Center for devices and radiological health s.d.).

Vírus Sincicial Respiratório



O *VSR* foi isolado pela primeira vez em 1956, num chimpanzé.

É a maior causa de pneumonia em crianças com menos de dois anos de idade.

Estima-se que, nos EUA, mais de 100.000 hospitalizações e 4500 mortes estejam relacionadas com a infecção pelo *VSR* anualmente.

É um vírus de RNA de cadeia única de sentido negativo, pertencente à família Paramyxoviridae, subfamília Pneumovirinae, género *Pneumovirus*.

Apresenta morfologia e componentes proteicos semelhantes aos do vírus *Parainfluenza*, compartilhando a capacidade de induzir a fusão entre células, e a consequente formação de sincícios e células gigantes multinucleadas. A principal diferença entre este vírus e os outros Paramixovírus, reside no seu nucleocapsídeo de menores dimensões e de não possuir hemaglutinina e actividade de neuraminidase.

Existem 2 subtipos de *VSR*, *A* e *B*. A infecção pelo tipo *A* tende a ser mais severa.

O período de incubação é em média de 2 a 8 dias e o período infeccioso de 3 a 8 dias, sendo que nas crianças se pode estender a 3 a 4 semanas. Dura em média 10 a 14 dias e a taxa de mortalidade para crianças hospitalizadas ronda 1% (J. B. Mahony 2008).

O vírus é eliminado nas secreções respiratórias durante vários dias, especialmente por lactentes, sendo por isso necessárias medidas de controlo de infecções.

O *VSR* é difícil de isolar em cultura, devido à sua grande labilidade e à necessidade de conservação em meio frio. A sensibilidade dos métodos de cultura varia entre 57% e 90%, quando comparados com a detecção rápida de antígenos por IFA .

O método SVC apresenta maior sensibilidade comparativamente aos métodos de cultura tradicionais, com obtenção de resultados num menor espaço de tempo. A sua sensibilidade varia de 62% a 92%, comparativamente com DFA, EIA e cultura (J. B. Mahony 2008). Estão disponíveis comercialmente testes SVC com células *R-Mix* - Diagnostic Hybrids Inc., Athens, OH. Muitos laboratórios usam uma combinação de detecção directa de antígenos por DFA e

SVC. A otimização de anticorpos monoclonais, permitiu o aumento da sensibilidade de DFA para valores entre 80 e 97% (Tang e Crowe 2007).

Foram usados métodos EIA rápidos durante muitos anos para a detecção deste vírus, fornecendo resultados em 15 a 30 minutos, no entanto com baixa sensibilidade. Cerca de uma dúzia de testes rápidos foram aprovados para o *VSR*. Apresentam desempenhos similares, no entanto com sensibilidades de apenas 80% a 85%, comparativamente com DFA e RT-PCR (J. B. Mahony 2008). O desempenho destes testes é ainda mais baixo quando comparados com as NAATs mais sensíveis. A especificidade destes testes decresce nos meses de Verão, quando a prevalência do vírus é mais baixa. Adicionalmente, verifica-se que a sua sensibilidade é menor em adultos do que em crianças, visto os primeiros apresentarem menores títulos virais.

Métodos moleculares de diagnóstico

Têm sido desenvolvidas NAATs sensíveis e específicas para responder à baixa sensibilidade dos testes convencionais.

Uma variedade de testes RT-PCR tem sido descrita, usando como alvo genes da fusão, do nucleocapsídeo e da subunidade da polimerase. A maioria deles apresenta maior sensibilidade que os métodos de cultura.

Um teste RT-PCR que usa como alvo o gene da fusão, detectou 122 amostras positivas de um total de 688 analisadas, comparativamente com 47 detectadas por cultura. Freymuth *et al*, descreveram um teste RT-PCR para detecção *VSR A* e *B*, com sensibilidade de 97,5% e especificidade de 63,9% (J. B. Mahony 2008).

Um teste NASBA comercialmente disponível, tendo como alvo o gene *F* (*NucliSens Easy Q RSV A and B*: bioMerieux) foi recentemente avaliado usando 508 amostras também testadas por DFA e cultura. Concluiu-se que NASBA foi mais sensível que os métodos de

cultura e DFA, apresentando sensibilidade de 99% e especificidade de 87% (Moore, Valappil e Corden 2006).

Foram ainda descritos vários testes *multiplex* para a detecção de *VSR* e outros vírus respiratórios. De notar que o primeiro teste *multiplex* era menos sensível que IFA e cultura.

O teste *Hexaplex* (Prodesse Inc.) foi avaliado num estudo envolvendo 254 amostras, demonstrando ter sensibilidade de 91% e especificidade de 98,6%. Num segundo estudo envolvendo 363 amostras, este evidenciou uma sensibilidade de 98,6% e uma especificidade de 97,9%. Syrmis *et al.* avaliaram um teste *multiplex* para a detecção de vários vírus respiratórios, incluindo *Influenza A e B*, *VSR A e B*, *Parainfluenza 1, 2 e 3* e *Adenovírus*, recorrendo a 598 amostras, das quais 123 positivas para *VSR*. Este demonstrou ter maior sensibilidade que métodos de cultura e IFA para a detecção do *VSR* (Syrmis, Whiley e Thomas 2004).

O *ProFlu+* (Prodesse Inc.) é um teste *real-time multiplex* do vírus *Influenza A e B*, *VSR A e B*, que foi recentemente aprovado pela FDA.

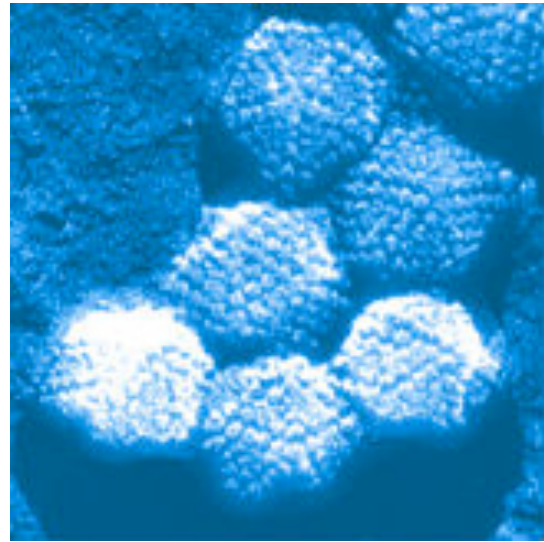
Recentemente, foram introduzidos 4 testes comerciais *multiplex*: *ResPlex II* (Quiagen), *MultiCode-PLx RVP* (EraGen Biosciences), *Seeplex RV* (Seegene Inc. Seoul South Korea), *NGEN RVA ASR kit* (Nanogen Inc. San Diego, California), *xTAG RVP* (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada). Este último apresenta sensibilidade de 100% para *VSR A e B* e especificidade de 98,4% e 97,4% para o *VSR A e B*, respectivamente. O teste *MultiCode-PLx RVP*, comparativamente com DFA e SVC, demonstrou ter sensibilidade e especificidade de 91,7% e 99,4%, respectivamente (Center for devices and radiological health s.d.).

Diversas empresas, como a Roche Diagnostics, a Abbott Molecular Diagnostics, a Cepheid e Prodesse Inc., desenvolveram *primers* e sondas específicos para detecção do *VSR*,

mas estes não foram exaustivamente avaliados e os seus desempenhos são ainda desconhecidos.

Resumindo, as NAATs são os métodos mais sensíveis para a detecção de *VSR*, seguido de DFA, SVC, cultura e EIA.

Adenovírus



O *Adenovírus* foi isolado pela primeira vez em 1953, em cultura de células adenóides humanas.

É responsável por cerca de 1 a 5% de todas as infecções respiratórias.

É um vírus de DNA linear de cadeia dupla, pertencente à família Adenoviridae. Este codifica as proteínas necessárias à síntese de mRNA e DNA, incluindo a sua própria DNA polimerase.

Existem pelo menos 51 serótipos. A diferença entre estes determina a natureza do tropismo tecidual e da doença produzida. Com base em estudos de homologia de DNA e padrões de hemaglutinação, os serótipos foram agrupados em 6 subgrupos (A a F). Os vírus de cada subgrupo compartilham diversas propriedades.

Os primeiros *Adenovirus* humanos identificados, designados pelos números de 1 a 7, são os mais comuns.

O período de incubação é em média de 2 a 14 dias, enquanto o período infeccioso pode variar de dias a meses. Após a infecção, o *Adenovirus* pode permanecer no hospedeiro por períodos variáveis de alguns dias a vários anos, na sua forma latente.

A persistência de *Adenovirus* e o prolongado período infeccioso obrigam a que as abordagens diagnósticas sejam capazes de detectar baixos títulos virais.

A infecção por *Adenovirus* pode ser diagnosticada por uma variedade de métodos tradicionais e moleculares.

Ensaio serológicos têm sido usados ao longo dos anos para quantificar a IgM específica ou elevação dos níveis de IgG. Contudo, estes não são actualmente usados para diagnóstico, visto serem demorados e menos específicos que os métodos de detecção antigénica ou de DNA.

O *Adenovirus* também pode ser detectado por microscopia electrónica. No entanto, esta é pouco sensível, limitando a sua utilidade a amostras de fezes onde a quantidade de vírus é elevada (J. B. Mahony 2008).

Os antígenos de *Adenovirus* podem ser detectados por DFA, no entanto este método tem baixa sensibilidade quando comparado com outros vírus respiratórios. De forma a aumentar a sensibilidade, esta técnica é usada em combinação com SVC.

Um estudo de detecção de *Adenovirus*, a SVC apresentou sensibilidade de 50% a 85%, ao fim de 2 dias, quando comparada com uma cultura de 14 dias. Este facto sugere que devem ser usados 5 dias de forma a otimizar a detecção por SVC (J. B. Mahony 2008).

Métodos moleculares de diagnóstico

Os métodos moleculares fornecem o melhor meio para detecção de *Adenovirus*, embora poucos estudos comparativos tenham sido executados.

Vários testes de *real-time* PCR têm sido descritos, alguns destes com capacidade para detectar os 51 serótipos.

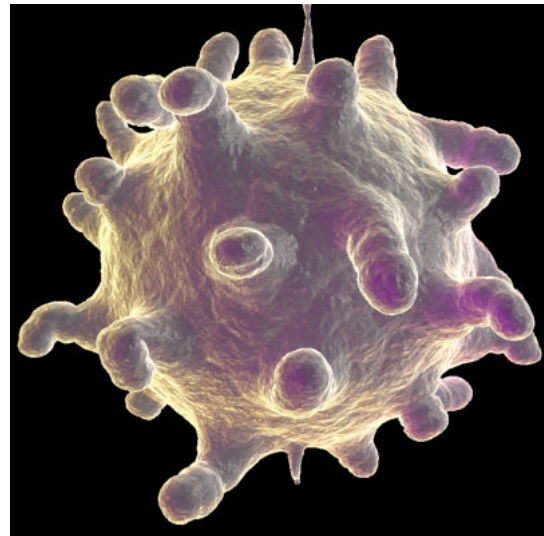
Echavarria *et al.* descreveram uma análise PCR, tendo como alvo o gene do hexão, que pode detectar 18 genótipos em amostras de urina. Vabret *et al.* desenvolveram testes cujos alvos são genes *VA* e do hexão. O estudo *VA* PCR mostrou ser o mais sensível dos dois. Ambos mostraram ser mais sensíveis que métodos de cultura, quando avaliados para 362 amostras de exsudado nasal. Heim *et al.* descreveram um estudo de PCR qualitativo que detecta os 51 genótipos, com uma sensibilidade de 98,1% (J. B. Mahony 2008).

O *Adenovirus* pode ser detectado por 3 ensaios PCR *multiplex* comercialmente disponíveis que detectam mais de 19 vírus respiratórios: *MultiCode-PLx* (EraGen), *ResPlex III* (Millipore), *xTAG RVP* (Luminex Molecular Diagnostics). No entanto, estes ensaios são recentes e o seu desempenho para detecção de *Adenovirus* é ainda desconhecido.

Apesar de existirem várias sondas e *primers* disponíveis comercialmente para detecção de *Adenovirus*, o ensaio *xTAG RVP* é o único ensaio molecular, aprovado pela FDA para detecção de *Adenovirus*, com sensibilidade de 78,3% e especificidade de 100% (Center for devices and radiological health s.d.).

Em resumo, os testes moleculares fornecem a maior sensibilidade na detecção de *Adenovirus*, seguido de métodos de cultura tradicionais, SVC e DFA.

Rinovírus



O *Rinovírus* é um vírus de RNA de filamento único, de sentido positivo, pertencente à família dos Picornaviridae. Existem mais de 200 serótipos.

Classicamente, assumia-se que o *Rinovírus* provocava unicamente infecções respiratórias superiores, e como tal, negligenciado pela enquanto causa de pneumonia. Contudo, estudos recentes revelaram taxas superiores às esperadas de infecções respiratórias inferiores por *Rinovírus* em crianças hospitalizadas.

O período de incubação varia de 2 a 3 dias e o período infecciosos de 7 a 10 dias. Produz quadros assintomáticos numa elevada percentagem de casos, mantendo-se a capacidade de transmissão, apesar da produção de menores títulos virais (J. B. Mahony 2008).

Tradicionalmente, a maioria dos laboratórios não diagnosticava as infecções por *Rinovírus*. A cultura é tecnicamente exigente e o diagnóstico serológico é difícil devido à carência de um grupo comum de antígenos. Tratando-se de uma infecção considerada clinicamente irrelevante, a indústria não sentiu necessidade de desenvolver anticorpos monoclonais para o seu diagnóstico.

Métodos moleculares de diagnóstico

A detecção de *Picornavírus*, incluindo *Rinovírus* e *Enterovírus*, encontra-se bem estabelecida por NAATs, visto ambos possuírem uma região 5'-não codificante (*NCR*), altamente conservada, que é um excelente alvo de amplificação. Contudo, não permitem a distinção entre estes dois grupos. Essa distinção pode ser feita usando uma segunda PCR específica para *Enterovírus*, pela criação de *primers* complementares com local específico de restrição enzimática, hibridização com sondas específicas ou o uso de *nested* PCR (J. B. Mahony 2008).

Técnicas de PCR tendo como alvo os genes *VP1* e *VP4* foram também usados para distinguir estes dois grupos (Kiang, Yagi e Kim 2007).

Num estudo realizado na Bélgica, comparando RT-PCR, NASBA e métodos de cultura tradicionais, usando 517 amostras respiratórias de crianças hospitalizadas, NASBA e RT-PCR produziram resultados comparáveis, ambas mais sensíveis que a cultura (Loens, Goossens e Laet 2006).

Blomqvist *et al.* descreveram um estudo de RT-PCR, usando como alvo a 5'-*NCR*, que detectou o dobro de amostras positivas para *Rinovírus* em comparação com a cultura. Outro estudo RT-PCR com o mesmo alvo apresentou sensibilidade de 98% comparada com 66% da cultura (J. B. Mahony 2008).

Técnicas *real-time* têm sido desenvolvidas, evidenciando também sensibilidade superior aos métodos moleculares clássicos.

Análises *multiplex* têm mostrado sensibilidade igual ou superior a ensaios *simplex*.

O teste *MassTag* recorre a tecnologia PCR *multiplex*, tem capacidade para detectar 22 vírus respiratórios, incluindo *Rinovírus* e bactérias patogénicas respiratórias.

Recentemente foram introduzidos comercialmente 4 testes *multiplex* para detecção de *Picornavírus*: *ResPlex II* (Quiagen), *MultiCode-PLx RVP* (EraGen Biosciences), *Seeplex RV* (Seegene Inc. Seoul, South Korea), *xTAG RVP* (Luminex Molecular Diagnostics, Toronto, Ontario, Canada). Este último é o único aprovado pela FDA para detecção de *Rinovírus*, apresentado sensibilidade de 100% e especificidade de 91,3% (Center for devices and radiological health s.d.).

FUNGOS

INTRODUÇÃO

O Ser Humano está constantemente a ser exposto a fungos.

No indivíduo saudável esta exposição é inócua, contudo a debilidade do hospedeiro torna-o susceptível a estas infecções oportunistas, nomeadamente doentes *HIV* positivos, em tratamento de quimioterapia e radioterapia, transplantados e portadores de neoplasias malignas.

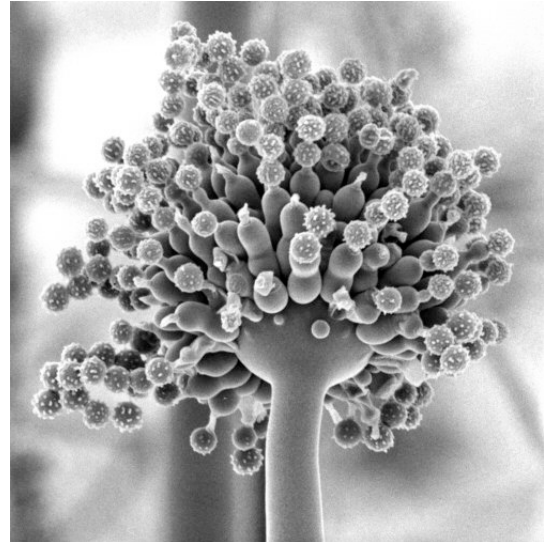
As pneumonias fúngicas são de difícil diagnóstico, devido à sua apresentação clínica e radiológica pouco específica. De forma a melhorar o prognóstico, é necessário, muitas vezes, recorrer a procedimentos diagnósticos invasivos (Chan e Morris 2007).

Os métodos tradicionais, serológicos e de cultura, possuem baixa sensibilidade, não distinguindo colonização de infecção.

As técnicas moleculares poderão vir a ser recursos de diagnóstico úteis neste tipo de infecções. No entanto, ainda não foi comprovada a sua utilidade no diagnóstico de infecções pulmonares fúngicas (Chan e Morris 2007).

Adicionalmente, apenas estão disponíveis testes moleculares para algumas espécies, nomeadamente *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e *Pneumocystis jirovecii*, não existindo dados na literatura referentes a outros fungos clinicamente relevantes, nomeadamente *Candida albicans*.

Aspergillus fumigatus



Este agente é muito frequente no meio ambiente.

Apesar de estarem descritas várias centenas de espécies de *Aspergillus*, o *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* são os mais frequentemente associados a doença clínica.

O seu espectro de apresentação é amplo, dependendo do local e do estado imunológico do hospedeiro. Indivíduos saudáveis não são susceptíveis ao desenvolvimento de aspergilose sistémica, tratando-se esta de uma infecção exclusivamente oportunista.

Recentemente foram desenvolvidos NAATs para detecção de *Aspergillus fumigatus*. A maioria dos ensaios focou-se em quadros de doença invasiva.

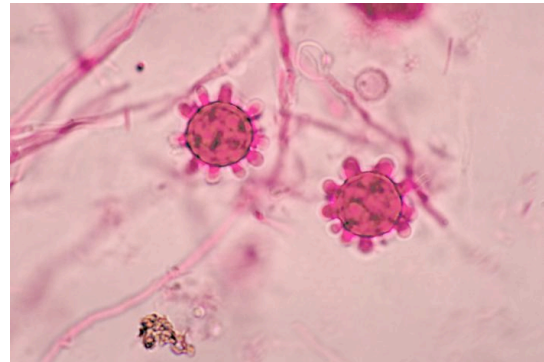
A sensibilidade da PCR varia de 45% a 92%, com especificidade superior a 90% para a maioria dos testes. Contudo, é uma técnica trabalhosa, dispendiosa e susceptível de contaminação (Wheat 2006).

Parece existir alguma utilidade na combinação de PCR com teste de *galactomannan*, no entanto o desempenho clínico desta estratégia ainda é desconhecido.

Alguns resultados promissores têm sido evidenciados com o uso de PCR quantitativa para aspergilose pulmonar (Gomez-Lopez, Martin-Gomez e Martin-Davila 2006).

Um teste *real-time* PCR para detecção de *18S rRNA* demonstrou ter especificidade de 100% e sensibilidade de 89%, quando testado em coelhos. O seu desempenho em doença humana não é conhecido (Gomez-Lopez, Martin-Gomez e Martin-Davila 2006).

Histoplasma capsulatum



A histoplasmose, também conhecida por doença dos espeleólogos, surge da inalação de conídeos ou fragmentos de hifas do *Histoplasma capsulatum*.

Na maioria dos casos é assintomática, mas em cerca de 5% observam-se sintomas clínicos de pneumonia aguda, seguidos com menos frequência de doença disseminada progressiva, dependendo do grau de exposição individual e do estado imunológico do doente.

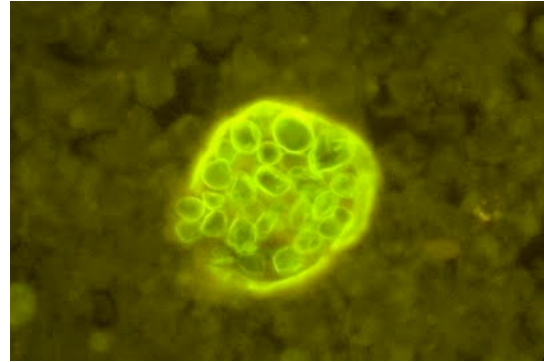
O *Histoplasma capsulatum* pode provocar doença progressiva potencialmente fatal em doentes imunodeprimidos.

Os microrganismos viáveis podem persistir no hospedeiro após a resolução da doença não-complicada. A infecção pelo HIV pode reactivar a latência do *Histoplasma capsulatum*.

Tradicionalmente, o diagnóstico de histoplasmose baseava-se em achados serológicos, exame histopatológico directo do tecido infectado e cultura. A sensibilidade é aumentada através da associação de cultura e exame histopatológico directo.

Apesar da PCR ter sido desenvolvida para *Histoplasma capsulatum*, esta está longe de possuir utilidade clínica, sendo escassos os dados disponíveis (Wheat 2006).

Coccidioides immitis

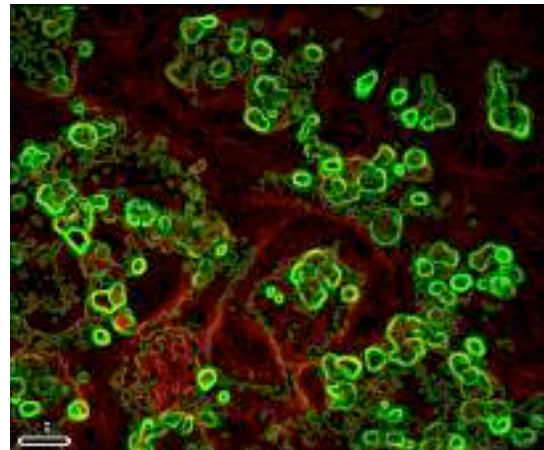


A inalação dos artroconídeos do *Coccidioides immitis* causa infecção respiratória aguda, geralmente autolimitada e benigna. No entanto, em casos raros, pode desenvolver doença disseminada potencialmente fatal.

O diagnóstico é feito por exame histopatológico directo e métodos serológicos.

Apesar da PCR ter sido desenvolvida para *Coccidioides immitis*, está longe de possuir utilidade clínica, à semelhança do que acontece com o *Histoplasma capsulatum* (Chan e Morris 2007).

Pneumocystis jirovecii



O *Pneumocystis jirovecii* causa infecções oportunistas, particularmente pneumonia, em doentes imunodeprimidos, sendo uma doença definidora de SIDA.

Continua a ser a infecção oportunista mais prevalente em doentes com SIDA, mesmo na era da terapêutica HAART.

O tratamento precoce tem benefício particularmente em doentes *HIV* negativos.

O diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* é difícil devido à ausência de clínica específica e à dificuldade de cultura deste agente.

A rotina de diagnóstico baseia-se na sua visualização microscópica. Esta depende da qualidade das amostras, número de microrganismos e experiência do observador.

A IFA tem capacidade de detectar ambas as formas, trófica e cística, no entanto, é mais demorada, dispendiosa e menos específica que as colorações histoquímicas convencionais. Por este motivo, muitos autores recomendam a IFA como o primeiro método, devendo ser confirmado por um segundo teste, de modo a aumentar a especificidade e o VPP.

O desafio da detecção de *Pneumocystis jirovecii* em doentes sem SIDA, com concentrações de organismos, levou ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis.

Vários marcadores bioquímicos têm sido estudados como indicadores de infecção por *Pneumocystis jirovecii*. Entre eles contam-se a LDH, o antígeno *KL-6* e β -*D-Glucan* (*BDG*).

Um estudo recente comparando indicadores séricos para diagnóstico de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, revelou que o *BDG* sérico é um marcador fidedigno, com uma sensibilidade e especificidade de 92,3% e 86,1%, respectivamente. Estudos preliminares sugerem que o *BDG* sérico pode ser útil como teste de diagnóstico não-invasivo de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*. No entanto, estes estudos necessitam de avaliação complementar do seu desempenho, para determinar os seus VPP e VPN em doentes de risco (Krajicek, Limper e Thomas Jr 2008).

Testes moleculares de diagnóstico

Recentemente, foram desenvolvidas técnicas moleculares para diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii*. Estas oferecem objectividade, assim como melhoria da sensibilidade e especificidade, comparativamente com a microscopia.

Vários autores descreveram estudos em amostras respiratórias, usando diversas populações de doentes, alvos, métodos de detecção, assim como plataformas de PCR, análises quantitativas e qualitativas.

Estas técnicas podem diminuir a necessidade de métodos invasivos de colheita de amostras. Larsen *et al.* descreveram o uso de PCR quantitativa em amostras de lavados orais, com sensibilidade de 88% e especificidade de 85% (Chan e Morris 2007).

A detecção de *Pneumocystis jirovecii* por PCR não fornece informação sobre a viabilidade ou infecciosidade do organismo. Um estudo de identificação de mRNA por RT-PCR, permitiu tal distinção, apresentando sensibilidade de 100% e especificidade de 86%.

Posteriormente, foram desenvolvidos métodos de *real-time* PCR para detecção deste microrganismo em amostras respiratórias e tecidos. As suas maiores vantagens prendem-se com a obtenção de resultados num espaço de tempo inferior a 3 horas, redução da possibilidade de contaminação e maior especificidade quando comparada com técnicas de PCR convencionais. Adicionalmente, a *real-time* PCR permite a quantificação exacta do DNA de *Pneumocystis jirovecii*, identificando portadores assintomáticos.

Arcenas *et al.* desenvolveram um estudo de *real-time* PCR em amostras de lavado broncoalveolar, com sensibilidade de 100% quando comparado com técnicas de coloração tradicionais (Chan e Morris 2007).

Huggett *et al.* desenvolveram um estudo para avaliar a *real-time* PCR, usando *primers* para o gene *HSP70*, em amostras de lavado broncoalveolar. Concluíram que é possível a

identificação deste agente, no entanto, ficou por definir a sua utilidade diagnóstica na rotina clínica (Hugget, Taylor e Kocjan 2008).

Um estudo comparando métodos de *nested* PCR e *real-time* PCR quantitativa para amplificação do gene *DHPS*, demonstrou que o segundo método apresenta maior especificidade (96% *versus* 81%).

Recentemente, a Mayo Clinic desenvolveu um teste de *real-time* PCR rápido, executado em amostras de lavado broncoalveolar, que detecta o gene *cdc2*. Este teste possui sensibilidade 21% superior a técnicas de coloração tradicionais; apresentou elevada especificidade, sem evidência de reacções cruzadas.

CONCLUSÕES

Apesar dos avanços no conhecimento da etiologia, epidemiologia e tratamento de pneumonia, esta permanece como uma das maiores causas de morbidade e mortalidade a nível mundial.

São inúmeros os agentes responsáveis por esta entidade. Contudo, na maioria dos casos, a sua etiologia permanece indeterminada.

Os métodos de diagnóstico etiológico tradicionais - exame directo, cultura de expectoração, hemoculturas e pesquisa de antígenos, não satisfazem as necessidades actuais, devido à sua baixa sensibilidade e especificidade, incapacidade de inúmeros microrganismos crescerem *in vitro* e à impossibilidade de disponibilizarem resultados em tempo considerado útil. Para além disso, não permitem a distinção entre infecção e colonização e são grandemente influenciados por antibioterapia prévia.

É neste contexto que surge a aplicação de técnicas moleculares para o seu diagnóstico etiológico.

Ao longo das últimas duas décadas, estas técnicas foram desenvolvidas e melhoradas, dispendo-se, hoje em dia, de métodos tão variados como a *PCR* e suas variantes, *NASBA*, ensaios *multiplex*, técnicas *real-time*, métodos quantitativos e *DNA microarrays*.

Estas técnicas têm a capacidade de tornar o diagnóstico mais rápido e eficaz, melhorando o prognóstico através da implementação, mais precoce, de antibioterapia adequada. Adicionalmente, são úteis na determinação da sensibilidade a fármacos, esclarecimento da epidemiologia, avaliação de microrganismos emergentes e identificação de epidemias, auxiliando no controlo de infecções.

Actualmente, algumas destas técnicas já possuem aplicação prática. No entanto, a maioria apresenta ainda limitações em termos de sensibilidade, especificidade, custos, complexidade de execução, necessidade de técnicos e equipamento especializado, que necessita de melhoramento, optimização e automatização, antes da sua adopção da prática clínica diária.

No entanto, trata-se de uma área em rápida expansão e desenvolvimentos futuros irão certamente levar à inclusão destes testes nas rotinas diagnósticas.

As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos foram avaliadas para a detecção da maioria dos agentes respiratórios e estão disponíveis testes comerciais para alguns deles. Contudo, a implementação de protocolos padronizados é necessária antes da sua generalização na rotina diagnóstica.

Para aceder globalmente ao benefício destas técnicas, não só os custos directos em termos de equipamentos e reagentes devem ser tomados em consideração, como os custos indirectos relacionados com a diminuição do uso de antibióticos e do tempo de internamento hospitalar.

O desenvolvimento e a adopção de testes *multiplex* têm mostrado grande benefício, visto oferecerem a possibilidade de detectar um maior número de infecções bacterianas, virais, fúngicas e mistas, com poupança de tempo e recursos. As infecções mistas foram desde sempre uma problemática em termos epidemiológicos. No entanto, os métodos *multiplex* ainda que não a resolvam, oferecem a possibilidade de a minimizar, através da pesquisa simultânea de um vasto painel de agentes.

Testes *real-time* quantitativos permitem a diferenciação entre colonização e infecção, evitando o uso desnecessário de antibioterapia, diminuindo a iatrogenia a ela associada.

Tendo em vista a massificação da antibioterapia em ambulatório e o papel desta em muitos resultados falsos-negativos, estas técnicas parecem ser menos influenciadas por antibioterapia prévia ou corrente.

A crescente facilidade de execução e conseqüente aumento do número de amostras testada possibilitará uma maior compreensão da epidemiologia, bioquímica, genética e da interacção dos agentes respiratórios com o Ser Humano.

Hoje em dia, e previsivelmente num futuro próximo, os métodos rápidos de diagnóstico de pneumonia não são passíveis de execução à cabeceira do doente. No entanto, perante o contínuo desenvolvimento da tecnologia, com o aparecimento, desenvolvimento e optimização de novos testes, este torna-se um objectivo concreto, que deve marcar todos os estudos presentes e futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdeldaim, GMK, K Stralin, P Olcen, J Blomberg, e B Herrmann. "Toward a quantitative DNA-based detection of pneumococcal pneumonia: comparison of *Streptococcus pneumoniae* target genes, with special reference to the Spn9802 fragment." *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008: 143-50.
- Apfalter, P, U Reischl, e MR Hammerschlag. "In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results?" *J Clin Microbiol*, 2005: 5835-41.
- Arend, S, D Soolingen, e T Ottenhoff. "Diagnosis and treatment of lung infection with nontuberculous mycobacteria." *Curr Opin Pulm Med*, 2009: 201-208.
- Barken, K, J Haagenen, e T Tolker-Nielsen. "Advances in nucleic acid-based diagnostics of bacterial infections." *Clinica Chimica Acta*, 2007: 1-11.
- Barnard, M, H Albert, e G Coetzee. "Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in high-volume public health laboratory in South Africa." *Am J Respir Crit Care Med*, 2008: 787-792.
- Bellau-Pujol, S, L Vabret, e J Legrand. "Development of three multiplex PCR assays for the detection of 12 respiratory viruses." *J Virol Methods*, 2005: 53-63.
- Benson, R, M Tondella, e M Carvalho. "Development and evaluation of a novel multiplex PCR technology for molecular differential detection of bacterial respiratory disease pathogens." *J Clin Microbiol*, 2008: 2074-77.
- Brittain-Long, R, S Nord, e S Olofsson. "Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections." *J Clin Virol*, 2008: 53-56.
- Carrillo, J, J Gutierrez, F Garcia, A Muñoz, E Villegas, e J Rojas. "Development and evaluation of a multiplex test for the detection of atypical bacterial DNA in community-acquired pneumonia during childhood." *Clin Microbiol Infect*, 2009: 473-480.
- Carvalho, MdGS, ML Tondella, e K McCaustland. "Evaluation and improvement of real-time PCR essays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA." *J Clin Microbiol*, 2007: 2460-6.
- Center for devices and radiological health. "Pre-market notification database, xTAG respiratory virus panel assay, K063765, FDA review, decision summary." 1-39.
- Chan, Y, e A Morris. "Molecular diagnosis methods in pneumonia." *Curr Opin Infect Dis*, 2007: 157-164.
- Covalciuc, KA, Webb KH, e Carlson CA. "Comparison of four clinical specimen types for detection of Influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods." *J. Clin Microbiol*, 1999: 3971-4.
- Dagher, H, H Donninger, P Hutchinson, R Ghildyal, e P Bardin. "Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR." *J Virol Methods*, 2004: 113-21.
- Daxboeck, F, R Krause, e C Wenisch. "Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection." *Clin Microbiol Infect*, 2003: 263-73.

Deng, J, Y Zheng, e R Zhao. "Culture versus polimerase chain reaction for the etiologic of diagnosis of community-acquired pneumonia in antibiotic pretreated pediatric patients." *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 2009: 53-55.

Diederer, B, C de Jong, e F Marmouk. "EVALUATION of a real-time PCR for the early detection of Legionella pneumophila DNA in serum samples." *J Med Microbiol*, 2007: 94-101.

Dinnes, J, J Deeks, e H Kunst. "A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection." *Health Technol Assess*, 2007: 1-196.

Ejigu, KS, e Y Woldeamanuel. "Microscopic observation of drug-susceptibility assay provides rapid and reliable identification of MDR-TB." *Int J Tuberc Lung Dis*, 2008: 332-7.

Ellis, J, D Fleming, e M Zambon. "Multiplex reverse transcription for surveillance of Influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996." *J Clin Microbiol*, 1997: 2076-82.

Fan, J, e J Hendrickson. "Rapid diagnosis of human Parainfluenza virus type 1 infection by quantitative reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay." *J Clin Microbiol*, 1996: 1914-17.

Fronhoffs, S, G Totzke, S Stier, N Wernert, M Rothe, e T Bruning. "A method for the rapid construction of cRNA standard curves in quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction." *Mol Cell Probes*, 2002: 99-110.

Gomez-Lopez, A, MT Martin-Gomez, e P Martin-Davila. "Detection of fungal DNA by real-time polymerase chain reaction: evaluation of 2 methodologies in experimental pulmonary aspergillosis." *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2006: 387-393.

Gruteke, P, AS Glas, M Dierdorp, WB Vreede, JH Pilon, e SM Bruisten. "Practical implementation of a multiplex PCR for acute respiratory tract infections in children." *J Clin Microbiol*, 2004: 5596-603.

Gunson, RN, TC Collins, e WF Carmen. "Real-time RT-PCR detection of 12 respiratory viral infections in four triplex reactions." *J Clin Virol*, 2005: 341-4.

Hayden, RT, JR Uhl, e X Qian. "Direct detection of Legionella from bronchoalveolar lavage and open-lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hibridization, direct fluorescence and antigen detection and culture." *J Clin Microbiol*, 2001: 2618-26.

Heath, C, D Grove, e D Looke. "Delay in appropriate therapy of Legionella-pneumonia associated with increased mortality." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1996: 286-90.

Hugget, JF, MS Taylor, e G Kocjan. "Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of Pneumocystis jirovecii DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients." *Thorax*, 2008: 154-159.

Huletsky, A, R Giroux, e V Rossbach. "New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from specimens containing a mixture of staphylococci." *J Clin Microbiol*, 2004: 1875-84.

Huletsky, A, V Rossbach, e F Gagnon. "Development of a real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from clinical specimens containing a mixture of Staphylococci." *IDI*, 2005.

Ieven, Margareta. "Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections." *Journal of Clinical Virology*, 2007: 259-276.

- Kashyap, B, S Kumar, GR Sethi, BC Das, e SR Saigal. "Comparison of PCR, culture and serological tests for the diagnosis of Mycoplasma pneumoniae in community-acquired lower respiratory tract infections in children." *Indian J Med Res*, 2008: 134-9.
- Kiang, D, S Yagi, e J Kim. "Molecular characterization of a variant Rhinovirus from an outbreak associated with uncommonly high mortality." *J Clin Virol*, 2007: 227-237.
- Krajicek, B, A Limper, e C Thomas Jr. "Advances in the biology pathogenesis and identification of Pneumocystis pneumonia." *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2008: 228-234.
- Krunic, N, T Yager, e D Himsworth. "xTAG RVP assay: analytical and clinical performance." *J Clin Virol*, 2007: S39-S46.
- Kuypers, J, N Wright, e J Ferrenberg. "Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children." *J Clin Microbiol*, 2006: 2382-88.
- Landry, M, e D Ferguson. "SimulFluor respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining." *J Clin Microbiol*, 2000: 708-11.
- Leland, DS, e CC Ginocchio. "Role of cell culture for virus detection in the age of technology." *Clin Microbiol Rev*, 2007: 49-78.
- Lindsay, D, W Abraham, e W Findlay. "Laboratory diagnosis of Legionnaires disease, due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods." *J Med Microbiol*, 2004: 183-7.
- Ling, DI, AA Zwerling, e M Pai. "GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug resistant tuberculosis: a meta-analysis." *Eur Respir J*, 2008: 1165-74.
- Loens, K, D Ursi, H Goossens, e M Ieven. "Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infection - Minireview." *J Clin Microbiol*, 2003: 4915-23.
- Loens, K, et al. "Evaluation of different nucleic acid amplification techniques for the detection of M. pneumoniae, C. pneumoniae and Legionella spp. in respiratory specimens from patients with community-acquired pneumonia." *J Microbiol Methods*, 2008: 257-262.
- Loens, K, H Goossens, e C Laet. "Detection of Rhinovirus by tissue culture and two independent application techniques, nucleic acid sequence-based amplification and reverse-transcription-PCR, in children with acute respiratory infections during a Winter season." *J Clin Microbiol*, 2006: 166-171.
- Loens, K, T Beck, D Ursi, S Pattyn, H Goossens, e M Ieven. "Two quality control exercises involving nucleic acid amplification methods for the detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae and carried out two years apart (in 2002 and 2004)." *J Clin Microbiol*, 2006c: 899-908.
- Mahony, J, S Chong, e F Merante. "Development of a respiratory virus panel test for the detection of twenty human respiratory viruses using multiplex PCR and a fluid microbead-based assay." *J Clin Microbiol*, 2007: 2965-70.
- Mahony, James B. "Detection of Respiratory Virus by Molecular Methods." *Clinical Microbiology Reviews*, 2008: 716-747.
- Mandell, LA, RG Wunderink, e A Anzueto. "Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults." 44 (2007): Suppl 2:S27.

- Marrie, Thomas J. "Epidemiology, pathogenesis, and microbiology of community-acquired pneumonia in adults." *UpToDate*, 2009.
- Martínez, M, M Ruiz, E Zunino, V Luchsinger, e L Avendaño. "Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in adult community-acquired pneumonia by PCR and serology." *J Med Microbiol*, 2008: 1491-95.
- McDonough, E, C Barrozo, K Russell, e D Metzgar. "A multiplex PCR ofr detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Bordetella pertussis* in clinical specimens." *Molecular and Cellular Probes*, 2005: 314-322.
- Menendez, R, A Torres, e R Zalacain. "Risk factors of treatment failure in community acquired pneumonia: implications for disease outcome." *Thorax*, 2004: 59:960.
- Mentel, R, U Wegner, e R Bruns. "Real-time PCR to improve the diagnosis of Respiratory Syncytial Virus infection." *J Med Microbiol*, 2003: 893-6.
- Millar, B, J Xu, e J Moore. "Molecular diagnostics of medically important bacterial infections." *Cur Issues Mol Biol*, 2007: 21-40.
- Mirken, B. "HIV resistance testing: more questions than answers." *AIDS Treat News*, 1997: 3-5.
- Moore, C, M Valappil, e S Corden. "Enhanced clinical utility of the NucliSens EasyQ RSV A+B assay for rapid detection of respiratory syncytial virus in clinical samples." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006: 167-174.
- Morgan, M, S Kalantri, e L Flores. "A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis." *BMC Infect Dis*, 2005: 62.
- Morozumi, M, E Nakayana, e S Iwata. "Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR, with pathogen-specific molecular beacon probes." *J Clin Microbiol*, 2006: 1440-6.
- Murdoch, D. "Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections." *APMIS*, 2004: 713-27.
- . "Diagnosis of *Legionella* infection." *Clin Infect Dis*, 2003: 64-69.
- Murdoch, David R. "Nucleic Acid Amplification Tests for the Diagnosis of Pneumonia." *Clinical Infectious Diseases*, 2003: 1162-70.
- Nolte, Frederick S. "Molecular Diagnostics for Detection of Bacterial and Viral Pathogens in Community-Acquired Pneumonia ." *Clinical Infectious Diseases*, 2008: 47:S123-6.
- Nyendak, M, D Lewinsohn, e D Lewinsohn. "Novos métodos de diagnóstico para a tuberculose." *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2009: 253-261.
- Pai, M, A Zwerling, e D Menzies. "Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update." *Ann Intern Med*, 2008: 177-184.
- Poon, LL, OK Wong, KH Chan, W Luk, KY Yuen, e JS Peiris. "Rapid diagnosis of a Coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS)." *Clin Chem*, 2003: 953-5.
- Ratcliff, R, G Chang, T Kok, e T Sloots. "Molecular diagnosis of medical viruses." *Curr Issues Mol Biol*, 2007: 87-102.

- Roson, B, J Carratala, e N Fernandez-Sabe. "Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia." *Arch Intern Med*, 2004: 164:502.
- Steingart, KR, e M Henry. "Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review." *Lancet Infect Dis*, 2006: 570-81.
- Stralin, K, E Tornquist, e MS Kaltoff. "Etiological diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples." *J Clin Microbiol*, 2006: 643-645.
- Strommenger, B, C Kettlitz, e T Weniger. "Assignment of Staphylococcus isolates to groups by spa typing, SmaI macrorestriction analysis and multilocus sequence typing." *J Clin Microbiol*, 2006: 2533-40.
- Syrmis, M, D Whiley, e M Thomas. "A sensitive specific and cost-effective multiplex reverse-transcriptase-PCR assay for the detection of 7 common respiratory viruses in respiratory samples." *J Mol Diagn*, 2004: 125-131.
- Tang, YW, e JE Crowe. "Respiratory Syncytial Virus and human Metapneumovirus." In *Manual of Clinical Microbiology, 9th Edition*, de PR Murray e EJ Baron, 1361-77. ASM Press, Washington DC, 2007.
- Templeton, K, SA Scheltinga, e M Beersma. "Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza 1, 2, 3 and 4." *J Clin Microbiol*, 2004: 1564-69.
- Templeton, KE, e SA Scheltinga. "Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequencing-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae." *J Clin Microbiol*, 2003a: 4366-71.
- Templeton, KE, SA Scheltinga, WC Van den Eeden, AW Graffelman, PJ Van den Broek, e EC Claas. "Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia, with real-time polymerase chain reaction." *Clin Infect Dis*, 2005: 345-51.
- Templeton, KE, SA Scheltinga, WC van den Eeden, AW Graffelman, PJ Van Den Broek, e EC Class. "Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction." *Clin Infect Dis*, 2005: 345-51.
- Tong, CY, e Harvey G Donnelly. "Multiplex Chain Reaction for the simultaneous detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae and Chlamydia psittaci in respiratory samples." *J Clin Pathol*, 1999: 257-63.
- Ursi, D, Dirven K, K Loens, e M Ieven. "Detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples by real-time PCR using an inhibition control." *J Microbiol Methods*, 2003: 149-53.
- Van Vliet, KE, P Muir, JM Echevarria, PE Klapper, GM Cleator, e AM Van Loon. "Multicenter proficiency testing of nucleic acid amplification methods for the detection of Enteroviruses." *J Clin Microbiol*, 2001: 3390-2.
- Vernet, G. "Molecular Diagnostics in Virology." *J Clin Virol*, 2004: 239-47.
- Vijgen, L, E Keyaerts, E Moes, P Maes, G Duson, e M Van Ranst. "Development of one-step, real-time, quantitative reverse transcriptase PCR for absolute quantitation of human Coronaviruses OC43 and 229E." *J Clin Microbiol*, 2005: 5452-6.

von Eiff, C, D Maas, e G Sander. "Microbiological evaluation of a new growth-based approach for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008: 1277-80.

Waites, KB, e DF Talkington. "Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen." *Clin Microbiol Rev*, 2004: 697-728.

Welti, M, K Jaton, M Altwegg, R Sahli, A Wenger, e J Bille. "Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract infections." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2003: 85-95.

Wheat, LJ. "Antigen detection, serology and molecular diagnosis of invasive mycosis in the immunocompromised host." *Transpl Infect Dis*, 2006: 128-139.

WHO. *WHO recommendations on the use of rapid diagnosis testing for Influenza*. 2005.

Yang, S, S Lin, e A Khalil. "Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adults emergency department patients." *J Clin Microbiol*, 2005: 3221-6.

Yu, V, J Plouffe, M Pastoris, e J Stout. "Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative study." *J Infect Dis*, 2002: 126-128.

ÍNDICE

RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUÇÃO.....	5
MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
PRINCÍPIOS BÁSICOS DAS TÉCNICAS MOLECULARES.....	8
AMOSTRAS.....	8
MÉTODOS MOLECULARES TRADICIONAIS.....	8
MÉTODOS TRADICIONAIS DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	9
Simplex – testes de alvo único.....	9
Polymerase Chain Reaction (PCR).....	9
Técnicas variantes de PCR.....	12
Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA).....	12
Multiplex – testes de alvo múltiplo.....	14
TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS REAL-TIME.....	15
Simplex – testes de alvo único.....	15
Multiplex – testes de alvo múltiplo.....	16
TESTES QUANTITATIVOS.....	17
DNA MICROARRAYS.....	17
CONTROLO EXTERNO DE QUALIDADE.....	19
MARCADORES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS.....	20
BACTÉRIAS.....	21
INTRODUÇÃO.....	21
Streptococcus pneumoniae.....	22
Haemophilus influenzae.....	25
Mycoplasma pneumoniae.....	26
Chlamydia pneumoniae.....	29
Legionella pneumophila.....	31
ENSAIOS SIMPLEX VERSUS MULTIPLEX.....	33
Staphylococcus aureus.....	35
Mycobacterium tuberculosis.....	38
Avanços na microscopia.....	39
Avanços em métodos de cultura.....	39
Avanços na amplificação de ácidos nucleicos.....	40
Avanços na detecção de resistência a fármacos.....	41

Avanços na detecção de tuberculose latente.....	43
Biomarcadores.....	45
Micobactérias não-tuberculosas.....	45
DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO EM DOENTES COM ANTIBIOTERAPIA PRÉVIA.....	47
VÍRUS.....	48
INTRODUÇÃO.....	48
Testes de diagnóstico tradicionais.....	49
Testes de diagnóstico molecular.....	50
Vírus Influenza.....	51
Vírus Parainfluenza.....	56
Vírus Sincicial Respiratório.....	59
Adenovírus.....	63
Rinovírus.....	66
FUNGOS.....	69
INTRODUÇÃO.....	69
Aspergillus fumigatus.....	70
Histoplasma capsulatum.....	71
Coccidioides immitis.....	72
Pneumocystis jirovecii.....	72
CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79