

**AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS GÊNICAS PELA REAÇÃO
EM CADEIA DA POLIMERASE: PRINCÍPIOS DO MÉTODO E
APLICABILIDADE EM DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS**

CÉLIA REGINA MONTE BARARDI

Depto. de Microbiologia e Parasitologia- Divisão de Imunologia-Centro de Ciências
Biológicas- Universidade Federal de Santa Catarina- Campus Universitário Trindade-
Cep 88040-900 Florianópolis- Santa Catarina- Brasil.

RESUMO

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de produção "in vitro" de grandes quantidades de DNA. Há sete anos atrás (desde que a técnica foi descrita) o PCR tem tido um impacto enorme na pesquisa médica e biológica. Desde então, muitos artigos de revisão e livros técnicos descreveram a teoria, os protocolos experimentais e a potencialidade do método no que se refere à sua aplicabilidade.

Este artigo comentará o princípio e a metodologia do PCR em laboratório clínico e suas aplicações em diagnóstico de infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias.

Um dos principais objetivos do presente artigo é o de determinar quais as doenças no qual o PCR oferece vantagens sobre os métodos convencionais de diagnóstico. Por exemplo, o PCR será o método de escolha para a detecção de patógenos que são difíceis, lentos ou impossíveis de cultivar "in vitro".

UNITERMOS: Diagnóstico; amplificação gênica; infecções virais; infecções bacterianas; infecções parasitárias

ABSTRACT

The Polymerase chain reaction (PCR) is an in vitro technique for producing large amounts of a specific DNA fragment. In the seven years since the method was published, it has had a major impact on medical research. Numerous reviews and technical books describe the theory, experimental protocols, and diverse application of PCR.

This article will cover the principle and practice of PCR in the clinical laboratory and applications for diagnosing viral, bacterial, fungal and parasitic diseases.

One of the main objective of this review is to indicate those diseases for wich PCR offers an advantage over conventional diagnostic methods. For example it may be preferred method for detecting pathogens that are difficult,slow or impossible to culture.

KEY WORDS: Diagnostic; genetic amplification; viral infections; bacterial infections, parasitic infections.

1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico rotineiro de doenças infecciosas baseia-se em dois tipos de exames clássicos: detecção do patógeno por microscopia óptica e/ ou eletrônica ou cultivo do mesmo em sistemas "in vitro". A detecção por microscopia é frequentemente pouco sensível e o cultivo, apesar de primar pela sensibilidade, não é rápido o suficiente para ampla utilização clínica. Esta desvantagem é aumentada quando se trata do diagnóstico de infecções virais, onde as culturas exigem recursos humanos treinados e laboratórios equipados. Além disso, muitos microorganismos dificilmente crescem num sistema "in vitro", inviabilizando a adoção desta metodologia.

Visando o aprimoramento das técnicas de detecção, adotou-se os métodos imunoenzimáticos, que baseiam-se na detecção de anticorpos específicos frente a um agente infeccioso. Mas, muitas vezes, o paciente encontra-se imunodeprimido ou em fase de latência viral (classicamente denominada "janela imunológica"). Estas limitações levaram os pesquisadores a aplicar técnicas de Biologia Molecular para a detecção de patógenos. Desta forma, todo o conhecimento adquirido com a clonagem e sequenciamento dos genes codificadores de proteínas importantes de inúmeros patógenos,foi assim aplicado ao diagnóstico clínico. Contudo, a análise de sequências específicas de nucleotídeos era frequentemente dificultada pela presença de materiais contaminantes e/ou pelas quantidades excessivamente pequenas de amostras biológicas disponíveis para análise (Saiki et al., 1988). Desde que foi descrita, a técnica da reação em cadeia da Polimerase (PCR) praticamente terminou com estas limitações já que transformou a maneira de analisar sequências de DNA tanto nos laboratórios de Pesquisa básica quanto em clínica (Saiki et al., 1985 e Mullis e Faloona, 1987).

Esta técnica é capaz de produzir um enriquecimento seletivo de sequências de DNA multiplicando-as por um fator de 10^6 facilitando grandemente a subsequente manipulação analítica destas sequências (Saiki et al.,1988) (Tabela 1).

Tabela 1* - Amplificação de um fragmento de DNA

Número do ciclo	Número de moléculas de DNA alvo amplificadas
01	0
02	0
03	2
04	4
05	8
06	16
07	32
08	64
09	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16384
17	32768
18	65536
19	131072
20	262144
21	524288
22	1048576
23	2097152
24	4194304
25	8388608
26	16777216
27	33544432
28	67108864
29	134217728
30	268435456
31	536870912
32	1073741824

* Extraído do livro Recombinant DNA (Watson e Gilman, 1992)

A reação é baseada no anelamento e extensão de dois oligonucleotídeos iniciadores que flanqueiam a sequência alvo a ser amplificada no DNA dupla fita. A amplificação deste DNA ocorre por ciclos repetitivos de desnaturação por calor, anelamento dos iniciadores na sequência complementar de DNA flanqueado e extensão destes iniciadores pela DNA polimerase. Após cada ciclo de desnaturação, anelamento e extensão, a quantidade de DNA é duplicada. O resultado é uma acumulação exponencial do fragmento de DNA alvo aproximadamente 2^n , onde n corresponde ao número de ciclos (Erich et al., 1991). O peso molecular desta sequência de DNA amplificada é igual à soma dos dois iniciadores mais a distância do DNA alvo entre estas duas sequências flanqueadoras (Figura 1).

2. PCR : CONSIDERAÇÕES PRÁTICAS E METODOLOGIA

Os estudos iniciais que desenvolveram a técnica de PCR (Saiki et al., 1988 ; Mullis e Faloona, 1987) utilizavam a DNA polimerase I "Klenow Fragment". A inativação desta enzima em altas temperaturas, tornava necessária a adição de novas quantidades de enzima após cada ciclo de desnaturação. Este obstáculo foi vencido pela introdução de uma DNA polimerase termo-estável isolada de uma bactéria termófila (*Thermus aquaticus*) e denominada Taq polimerase (Brock e Freeze, 1969). Com a introdução desta enzima, além de eliminar-se a necessidade de introdução de alíquotas de enzima após cada ciclo, pode-se aumentar a estringência das reações, permitindo a amplificação de fragmentos maiores que 1Kb em misturas complexas de ácidos nucleicos, sendo que estes fragmentos puderam ser analisados por simples eletroforese em gel de agarose e coloração por brometo de etídeo (Saiki et al., 1988). Estas vantagens adviram do fato que a Taq polimerase permite que os iniciadores sejam anelados e estendidos a temperaturas superiores das permitidas quando da utilização da enzima termo sensível.

Desde a sua introdução, os protocolos de reação de PCR foram reformulados no sentido de diminuir a frequência de incorporação errônea de nucleotídeos e aumentar a especificidade e o peso molecular dos produtos do PCR. Estes protocolos utilizaram concentrações menores dos desoxiribonucleotídeos nas reações (dNTPs) e $MgCl_2$, aumentaram a temperatura de anelamento dos iniciadores e reduziram os tempos de extensão (Eckert e Kunkel, 1990 ; Gelfand e White, 1990). O aprimoramento das reações ainda foi aliado ao desenvolvimento de termocirculadores disponíveis comercialmente que automatizaram totalmente a reação estendendo a utilização do PCR em diversas áreas do conhecimento tais como: detecção de patógenos virais, bacterianos e parasitários, detecção de oncogenes ativados, mapeamento genético, clonagem de genes, sequenciamento de mutações gênicas e construção de mutantes (Gibbs, 1990). A tabela 2 fornece os parâmetros atualmente adotados para as reações de PCR.

PCR: Princípios e Aplicabilidade em Diagnóstico

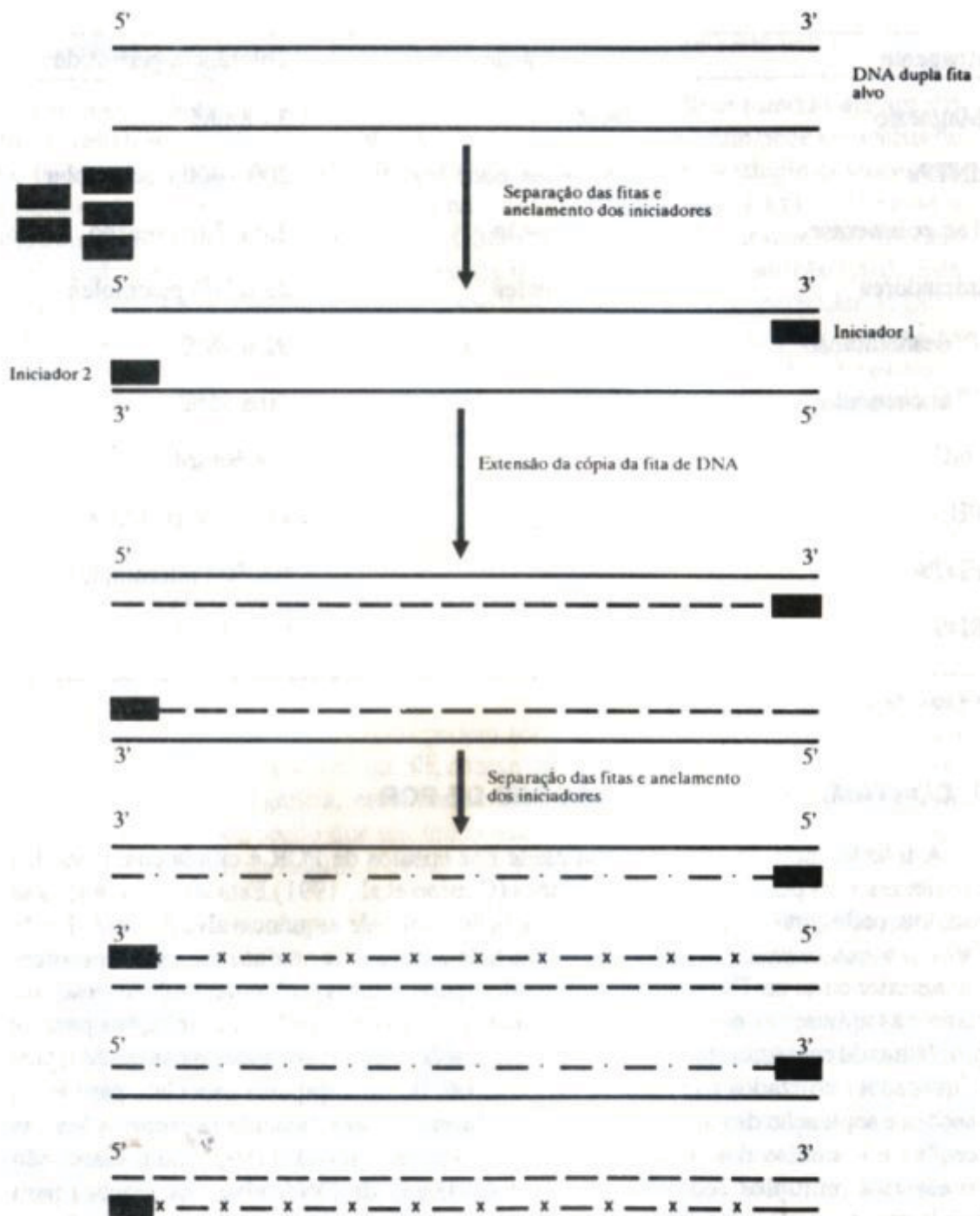


Figura 1. A reação em cadeia da polimerase dirige a amplificação das seqüências de DNA flanqueadas pelos iniciadores.

Tabela 2* - Parâmetros ideais para a padronização de uma reação de PCR

Reagente	Concentração ótima	Tolerância permitida
Magnésio	4mM	3 - 8mM
dNTPs	200micromolar	200 - 400 micromolar
Taq polimerase	2,5 U/reação	2,0 a 5,0U/reação
Iniciadores	50picomoles	25 a 100 picomoles
T° desnaturação	95° C	92 a 98°C
T° anelamento	55° C	50 a 55°C
NaCl	-	0 a 30mM
PBS	-	até 10 microlitros
EDTA	-	0 a 500 micromolar
SDS	-	0 a 0,01%

*Extraída de White et al.,(1992)

3. CONTAMINANTES NAS REAÇÕES DE PCR

A interferência de DNA contaminante nos ensaios de PCR é citada como um dos problemas mais perniciosos destas reações (Cimino et al., 1991). Esta técnica, como já se estudou, pode gerar trilhões de cópias de uma determinada sequência alvo de DNA. Desta forma a contaminação pode advir de traços indetectáveis de produtos de uma amplificação anterior ou de um DNA exógeno que podem gerar muitos problemas tanto na pesquisa como nas aplicações em diagnóstico clínico (Erlich et al., 1991). As soluções para os problemas de contaminação vieram com a separação exclusiva de todos os reagentes (pré-aliquotados) utilizados nas reações de PCR; uso de micropipetas especiais para estas reações e separação das áreas físicas onde se fazem respectivamente as preparações das reações e a análise dos produtos do PCR (Higuchi e Kwok, 1989). Além disso, são necessários múltiplos controles negativos (ausência de DNA alvo na reação) para monitorar e revelar possíveis contaminações. Outra estratégia para inativação de possíveis contaminantes das reações de PCR, envolve a irradiação ultravioleta da mistura de reação antes da amplificação (Sarkar e Sommer, 1990). Esta estratégia requer, entretanto, a adição da DNA polimerase e do DNA alvo após o passo de irradiação.

4. DETECÇÃO DOS PRODUTOS GÊNICOS AMPLIFICADOS PELO PCR.

4.1- Digestão do Produto gênico por endonuclease de restrição

No caso de detecção de mutações gênicas por PCR, quando as mesmas afetam um sítio de restrição reconhecido por uma determinada enzima, o produto pode ser analisado por tratamento enzimático e eletroforese (Boehm,1989). Como exemplo citamos uma mutação puntual cuja substituição de uma Adenina (A) por uma Timina (T) causa a substituição de um aminoácido (no caso a Glutamina é substituída por uma Valina). Esta substituição destrói um sítio de reconhecimento pela enzima de restrição *CunI*. Esta alteração pode ser facilmente detectada como uma alteração no peso molecular do DNA após clivagem por *CunI*, eletroforese em gel de agarose e coloração pelo brometo de etídeo (Chehab et al.,1987). O brometo de etídeo, que intercala no DNA, fluoresce sob luz ultravioleta e torna os fragmentos de DNA visíveis no gel. A migração dos fragmentos após a eletroforese depende do peso molecular do DNA.

Aproximadamente 50% das beta-talassemias alteram um sítio da enzima de restrição criando-o ou destruindo-o quando a mutação está presente. Estas mutações podem ser rapidamente detectadas por digestão do produto amplificado do gene da beta-globina e eletroforese em gel de agarose (Kazazian e Boehm,1988).

4.2- Detecção por hibridização molecular.

Os produtos gênicos amplificados podem ser detectados também pelo uso de uma sonda genética complementar (ex:um oligonucleotídeo)(Saiki et al.,1986). Utilizando-se condições de alta estringência, estas sondas irão hibridizar somente com sequências gênicas idênticas a ela, sendo que um único nucleotídeo de diferença é suficiente para desestabilizar a molécula duplex e evitar a hibridização.

Para análise, o DNA amplificado é imobilizado em uma membrana de nylon e então hibridizado com a sonda que estará marcada (radioativa ou não-radioativamente).

Para a hibridização, controles positivos e negativos devem ser incluídos em cada membrana, para indicar se as condições salinas e de temperatura ideais para a especificidade máxima da sonda foram encontradas.

4.3- Eletroforese em gel de agarose para detecção de produtos amplificados.

Um produto de amplificação ,pode em muitos casos, ser detectado por eletroforese em gel de agarose sem que haja a necessidade de digestão por enzima de restrição ou de hibridização molecular (Boehm,1989). Como exemplo citamos uma deleção gênica que

pode ser observada diretamente como uma alteração no peso molecular do produto amplificado.

No caso de amplificação de patógenos para diagnóstico de infecções, normalmente a positividade do teste é revelada por um fragmento de DNA de peso molecular definido que pode ser submetido ou não à digestão por enzimas de restrição ou para hibridizar com sondas genéticas específicas para testes confirmatórios.

5. APLICAÇÃO DO PCR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS

Uma das primeiras aplicações médicas do PCR foi no diagnóstico de doenças genéticas onde as mutações poderiam ser estudadas diretamente e para a detecção de sequências de patógenos, particularmente quando os mesmos são de difícil cultivo. Para os vírus, o PCR oferece a vantagem de detectar sequências latentes e vírus não-cultiváveis "in vitro" tais como, HIV, papilomavírus humano e alguns enterovírus. Permite ainda a detecção direta dos patógenos ao invés de verificar a resposta imunológica do hospedeiro frente a uma infecção (White et al., 1992).

5.1- Diagnóstico de Infecções Virais.

As aplicações clínicas do PCR, particularmente nas infecções virais, tem sido revista e inclui a detecção de infecções neonatais, infecções recentes, resolução de sorologias indeterminadas, tipagem viral e identificação de novos agentes (White et al., 1992).

5.1.1- HIV

No caso do HIV causador da AIDS, a presença do agente etiológico é normalmente detectada pela presença de anticorpos específicos pelo uso de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) com ensaios confirmatórios de Western blot (imunoblot) ou pelo isolamento viral por técnicas de cocultivo (Burke et al., 1988; Jackson et al., 1987). Entretanto, existem certas situações clínicas onde o diagnóstico pela detecção de anticorpos é prejudicado por uma série de razões: insensibilidade dos testes de detecção, relativa ou absoluta falta de vírus circulantes devido à latência viral ou presença de provírus defectivo (Sönnnerborg et al., 1990; Farzadegan et al., 1988; Imagawa et al., 1989). O emprego do PCR neste caso torna a detecção de sequências genômicas virais extremamente sensível em indivíduos que pertencem aos chamados "grupos de risco" mas que são negativos nos testes sorológicos disponíveis até o momento. Estes indivíduos muitas vezes constituem reservatórios ocultos de infecção viral (Soriano et al., 1990).

Esta forma de detecção tem sido cada vez mais simplificada sem que, com isso, a especificidade e sensibilidade do método sejam prejudicados. Alguns autores, procediam à purificação, amplificação e detecção do produto final utilizando sondas genéticas

PCR: Princípios e Aplicabilidade em Diagnóstico

radioativas (Royfield et al.,1988). Atualmente já existem técnicas de amplificação de DNA para detecção de sequências provirais de HIV-1 em lisados brutos de células mononucleares sanguíneas utilizando sondas não radioativas para detecção das sequências amplificadas (Conway et al., 1990). A tabela 3 fornece algumas das diferentes metodologias para detecção de HIV por PCR.

Tabela 3 - Diferentes formas de detecção do HIV em espécimes humanos

Metodologia	Referência
Sangue total	Fiore et al.,(1990)
Plasma	Ehrnst et al.,(1988)
Fluido cerebro-espinhal	Goswami et al.,(1991)
Macrófagos do pulmão	Clarke et al.,(1990)
Sangue seco em filtro	Cassol et al.,(1991)
Extrato celular bruto de sangue periférico	Conway et al.,(1990)

5.1.2- Detecção de Rotavírus por PCR.

Os Rotavírus constituem a principal causa de diarreia infantil em todo o mundo e são extremamente difíceis de serem cultivados "in vitro" a partir de amostras de fezes infectadas. Desta forma, a detecção clássica destes patógenos ocorre diretamente das amostras de fezes por ensaios imunológicos (Hughes et al.,1984). Entretanto, existem situações em que ensaios de maior sensibilidade são desejáveis a fim de detectar partículas virais mesmo em minúsculas quantidades em amostras fecais (Miotti et al.,1985). Wilde et al.,(1990) descreveram uma metodologia aperfeiçoada de PCR para detecção de rotavírus em espécimes fecais, que permitiram a detecção de menos de 1 picograma de RNA genômico viral nestes espécimes.

5.1.3-Detecção de Vírus da Hepatite B e Hepatite C.

Sabe-se que o vírus da hepatite B é a principal causa de hepatite crônica e de hepatoma na Ásia e que a infecção por HBV nos Estados Unidos tem aumentado gradativamente pelo uso de drogas injetáveis. As infecções crônicas pelo HBV levam a uma produção persistente de antígeno de superfície viral (HBsAg) e antígeno de envelope viral (HBeAg) pelos hepatócitos infectados (Hindman et al.,1976). Em pacientes portadores de hepatite crônica, os testes sanguíneos para detecção dos antígenos virais são considerados como um bom índice de replicação viral (Takahashi et al.,1976).

Atualmente, os pesquisadores provaram que a detecção do DNA do HBV no soro deve ser superior a testes sorológicos para a varredura de doadores de sangue e monitoração da evolução de uma hepatite crônica e da efetividade de determinada terapia antiviral (Sun et al.,1988).

Já está estabelecido que a amplificação das sequências por PCR seguida pela hibridização de Southern para detecção é o método mais sensível para detecção do HBV no soro.

Quando se utiliza o PCR, a sensibilidade aumenta 10 vezes quando comparada à técnica de hibridização molecular com sequências gênicas não amplificadas (Kaneko et al.,1989).

No caso do vírus da hepatite C (HCV), considerado como o principal agente etiológico causador de 90 a 95% das hepatites pós-transfusionais não A, não B, a detecção era feita basicamente por ensaios imunológicos (ELISA) baseando-se na procura do antígeno C100-3 no soro dos pacientes com doenças hepáticas crônicas (Kuo et al.,1989). Entretanto, tem sido descritas, reações de ELISA não específicas para detecção de anticorpos antiHCV e dúvidas tem sido levantadas com relação a validade destes testes (Wong et al.,1990).

Neste caso, novamente a técnica de PCR foi usada como um teste de referência para soros controversos para confirmar a presença ou a ausência do RNA do HCV (Lazizi et al.,1992).

A tabela 4 fornece uma lista destas e de outras infecções virais que podem ser diagnosticadas por PCR.

Tabela 4 - Doenças virais detectadas por PCR

Vírus	Doença associada
Vírus da Imunodeficiência (HIV 1 e 2)	Aids
Herpes Vírus (HSV 1 e 2)	Encefalite
Papilomavírus (HPV)	Câncer cervical
Hepatite Vírus(HBV e HCV)	Hepatite
Vírus linfotrópico (HTLV 1 e 2)	Leucemias crônica e aguda
Dengue Vírus	Dengue
Rotavírus(Grupo A,B e C)	Gastroenterite
Vírus respiratório sincicial (RSV)	Infecções respiratórias
Citomegalovírus (CMV)	

5. 2- Infecções bacterianas

No caso das infecções bacterianas, a cultura dos microorganismos sempre foi o método de escolha para diagnóstico. Nestes casos, a potencialidade do PCR seria aplicada para detectar patógenos de crescimento lento; ou de crescimento perigoso (com risco de contaminação para os técnicos de laboratório).

Um exemplo importante de diagnóstico de infecção bacteriana está na detecção da *Mycobacterium tuberculosis* por esta metodologia (Cousins et al.,1992). A tuberculose é uma doença mundialmente disseminada, principalmente em países do 3º mundo. Dados recentes de literatura sugerem que existem 20 milhões de casos de tuberculose no mundo e que 5000 pessoas morrem por dia acometidas por esta doença (Dawson,1990). Entretanto,este microorganismo tem um crescimento lento sendo que o diagnóstico laboratorial clássico demora cerca de 10 dias. Além de demorado, alguns autores estimam que a sensibilidade do cultivo do microorganismo como método de diagnóstico é menor que 50% (Park et al.,1984). Os pesquisadores descreveram desta forma o diagnóstico da tuberculose utilizando a técnica do PCR.

Normalmente a sequência de DNA a ser amplificada é um segmento gênico que codifica um antígeno de 65 kd presente em todas as espécies de micobactérias (Pao et al.,1990) ou o antígeno MPB64 específico para o complexo *M. tuberculosis* (Shankar et al.,1991). Os procedimentos que poderiam ser utilizados em rotina em laboratórios clínicos para identificar *M. tuberculosis* podem ser feitos em aproximadamente 4 horas (Cousins et al.,1992).

A tabela 5 sumariza outras aplicações do PCR na detecção de patógenos bacterianos.

Tabela 5 - Doenças bacterianas detectadas por PCR

Patógeno	Doença associada
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose
<i>Legyonella spp</i>	Pneumonia severa atípica
<i>Vibrió cholerae</i>	Cólera
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Doença de Lyme
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Uretrites em homens e cervicites em mulheres
<i>Mycobacterium leprae</i>	Lepra
<i>E.coli e Shiguella</i>	Diarréia aguda
<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifóide
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis
<i>Clostridium dificile</i>	Diarréia
<i>Legionella pneumophila</i>	Pneumonia

Outra oportunidade para o diagnóstico por PCR envolve a susceptibilidade a antibióticos. Omissi et al.,(1990) tem demonstrado a correlação entre a presença de vários genes codificadores de enzimas modificadoras de antibióticos e sensibilidade bacteriana "in vitro". Por seleção rigorosa de sequências gênicas conservadas destas enzimas é possível detectar, por exemplo, todas as beta-lactamases ou somente aquelas associadas às penicilinas produzidas pela *Neisseria gonorrhoea* (Mabilat and Courvalin,1990).

5.3- Infecções parasitárias e fúngicas.

As vantagens da velocidade, simplicidade e segurança no laboratório oferecidas pelo PCR estendeu a utilização deste método para o diagnóstico de muitas infecções causadas por fungos e parasitas (de Bruijn,1988).

Citamos neste trabalho o importante exemplo da malária. A identificação recente da heterogeneidade entre diferentes antígenos candidatos à vacina e de seus genes codificadores tem estimulado o desenvolvimento de metodologias que facilitem a detecção dos polimorfismos genéticos deste parasita (Schriefer et al.,1991). Historicamente, a identificação destas infecções depende da visualização microscópica dos parasitas tanto no sangue quanto em mosquitos (vetores). Esta metodologia é no entanto trabalhosa e não permite nenhuma estimativa de heterogeneidade intraespecífica dos parasitas (Schriefer et al.,1991).

A utilização recente de iniciadores que flanqueiam vários genes de interesse do parasita permitiu a detecção de muitas variantes genéticas importantes (Fenton et al.,1991). Estes ensaios tem utilizado amostras de sangue infectado ou parasitas cultivados "in vitro" como fonte de DNA do parasita. Desta forma, o PCR tem contribuído tanto para estudos clínicos e epidemiológicos de malária como tem permitido a análise da heterogeneidade gênica destes parasitas.

Como exemplo importante de infecções fúngicas detectadas pelo PCR citamos o diagnóstico da candidíase.

O microorganismo *Candida albicans* tem sido reconhecido mundialmente como um patógeno importantíssimo em pacientes imunodeprimidos. O diagnóstico pela detecção do patógeno no sangue, entretanto, nem sempre é bem sucedido. Culturas de sangue de pacientes com candidíase disseminada, por exemplo, são frequentemente negativas (Dupont,1990). A quimioterapia também pode levar a culturas negativas (Dupont,1990).

Outra forma de diagnóstico seria o sorológico. Mas, a habilidade dos pacientes imunodeprimidos em produzir anticorpos está marcadamente reduzida (Kauffman,1983).

Assim a técnica do PCR e sua possibilidade de detectar um único microorganismo nos espécimes clínicos, facilitou a detecção da *Candida albicans* (Miyakawa et al., 1992) e também de outros fungos entre os quais várias espécies de *Cryptococcus* (Vilgalys e Hester, 1990).

A tabela 6 sumariza algumas das aplicações já publicadas de diagnóstico de infecções fúngicas e parasitárias por PCR.

Tabela 6 - Infecções fúngicas e parasitárias detectadas por PCR

Patógeno	Doença associada
<i>Candida albicans</i>	Candidíase
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malária
<i>Onchocerca volvulus</i>	Oncocercose
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Doença de Chagas
<i>Leishmania brasiliensis</i>	Leishmaniose
<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplasmose

CONCLUSÃO

A versatilidade da reação de PCR é enorme e muito poderia ainda ser comentado sobre o impacto desta técnica no laboratório clínico. Como pode-se prever, a natureza técnica desta reação deverá exigir o treinamento de profissionais no campo da Biologia Molecular que sejam totalmente aptos em analisar os produtos de reação. Atualmente, são raros os Programas de Residência Médica, Programa de Treinamento de equipes médicas e de laboratoristas que oferecem instruções específicas de genética molecular. Devido à extrema potencialidade desta metodologia, não só no diagnóstico de infecções de várias naturezas como também na detecção de doenças genéticas e câncer, o treinamento e o aprofundamento dos estudos nesta área devem ser estimulados

Além disso, será extremamente positiva a colaboração de clínicos, pesquisadores e profissionais de laboratório a fim de integrar-se os resultados obtidos com o PCR à história clínica do paciente, apresentação da doença e tratamentos adequados.

Em conclusão a amplificação do material genético terá, indubitavelmente um impacto futuro substancial tanto no campo da pesquisa básica quanto na pesquisa clínica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Cleidson Valgas, bolsista de Iniciação Científica do CNPq, pela colaboração na datilografia deste artigo.

REFERÊNCIAS

- Boehm, C.D. (1989). Use of PCR for diagnosis of inherited disorders. *Clin. Chem.* 35(9): 1843-1848.
- Boswami, K.K., Miller, R.F., Harrison, M.J., Hamel, D.J., Daniels, R.S. and edder, R.S.(1991). Expression of HIV-1 in the cerebrospinal fluid detected by the PCR and its correlation with central nervous system disease. *AIDS*, 5(7): 797-803.
- Brock, T.D. and Freeze, H. (1969). *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *J. Bacteriol.* 98: 289-297.
- Burke, D.S., Brundage, J.F., and Redfield, R.R. (1988). Measurement of the false positive rate in a screening program for HIV infections. *N. Engl. J. Med.* 319: 961-964.
- Cassol, S., Salas, T., Arella, M., Neumann, P., Schechter, M.T. and Shaughnessy, M. (1991). Use of dried blood spot specimen in the detection of HIV-1 by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 29(4):667-671.
- Chehab, F.F. Doherty, M., Cai, S., Kan, Y.W., Cooper, S., Rubin, E. (1987). Detection of sickle cell anemia and thalassemias. *Nature (London)* 329: 293-294.
- Cimino, G.D., Metchette, K.C., Tessman, J.W., Hearst, J.E., and Isaacs, S.T. (1991). Post-PCR sterilization: A method to control carryover contamination by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 19: 99-107.
- Clarke, J.R., Krishnan, V., Bennett, J., Mitchell, D. and Jeffries, D.J. (1990). Detection of HIV-1 in human lung macrophages using PCR. *AIDS* 4(11): 1133-1136.
- Conway, B., Adler, K.E., Bechtel, L.J., Kaplan, J.C. and Hirsch, M.S. (1990). Detection of HIV-1 DNA in crude cell lysates of peripheral blood mononuclear cells by PCR and nonradioactive oligonucleotide probes. *J. Acq. Immune Def. Synd.* 3: 1059-1064.
- Cousins, D.V., Wilton, S.D., Francis, B.R. and Gow, B.L. (1992). Use of PCR for rapid diagnosis of tuberculosis. *J. Clin. Microb.* 30(1):255-258.
- Dawson, D.J. (1990). Tuberculosis in Australia: an unfinished fight. *Med. J. Aust.* 154: 75-76. de Bruijn, M.H.L. (1988). Diagnostic DNA amplification: No respite for the elusive parasite. *Parasitol. Today* 4: 293-295.

- Dupont, B.(1990). Clinical manifestations and management of candidosis in the compromised patient p. 55-84 in D.W. Warnock and Richardson (ed) Fungal infection in the compromised patient 2nd ed. John Wiley & Sons Inc. New York.
- Ehrnst, A., Sonnerborg, A., Bergdahl, S. and Strannegard, O. (1988). Efficient isolation of HIV from plasma during different stages of HIV infection. *J. Med. Virol.* 26: 23-32.
- Erich, H.A., Gelfand, D. and Sninsky, J.J. (1991). Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science.* 252:1643-1651
- Farzadegan, H., Polis, M.A. and Wolinsky, S.M. (1988). Loss of HIV-1 antibodies with evidence of viral infection in asymptomatic homosexual men. *Ann. Intern. Med.* 108: 785-7990.
- Fenton, B., Clark, J.T., Anjam, K., Robinson, J.V., Walliker, D., Ridley, R., Scaife, J.G. and McBride, J.S. (1991). Structural and antigenic polymorphism of the 35 to 48 Kd merozoite surface antigen (MSA-2) of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Molec. and Cell. Biol.* II: 963-971.
- Fiore, J.R., Angarano, G., Fico, C., Monno, L., Carbonara, S., Salamina, G.F; Fracasso, C. and Pastore, G. (1990). HIV isolation from whole blood: a new approach to HIV detection. *Microb.* 13:311-319.
- Gelfand, D.H. and White, T.J., in PCR Protocols: a guide to Methods and Applications, Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. Eds (Academic Press, San Diego, CA, 1990): 129-141.
- Gibbs, R.A. (1990). DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Anal. Chem.* 62: 1202-1214.
- Higuchi, R. and Kwok, S. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-238.
- Hindman, S.H., Gravelle, C.K., Murphy, B.L., Bradley, D.W., Budge, W.R. and Maynard, J.E. (1976). Antigenic particles and serum DNA polymerase activity in a HBSAg carrier. *Ann. Intern. Med.* 85: 458-460.
- Hughes, J.H., Tuomari, A.V., Mann, D.K. and Hamparian, V.V.(1984). Latex immunoassay for rapid detection of rotavirus. *J. Clin. Microbiol* 20: 441-447.
- Imagawa, D.T., Lee, M.H. and Wolinsky, S.M. (1989). HIV-1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. *N. Engl. J. Med.* 320: 1458-1462.

- Jackson, J.P., Nair, P. and Alexander, S. (1987). Early diagnosis of HIV in neonate. *N. Engl. J. Med.* 316: 273-274 (Letter).
- Kaneko, S., Reinstone, S.M. and Mieller, R.H. (1989). Rapid and sensitive method for the detection of serum hepatitis B virus DNA using the PCR technique. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1930-1933.
- Kauffman, L. (1983). Mycoserology its vital role in diagnosing systemic mycotic infections. *Jpn J. Med. Mycol.* 24: 1-8.
- Kazazian, Jr H.H., Boehm, C.D. (1988). Molecular basis and prenatal diagnosis of beta thalassemia. *Blood* 72: 1107-1116.
- Kuo, G., Choo, Q.L., Alter, H.J., Gitnick, G.L., Redeker, R.H., Purcell, T., Miayamura, J.L., Dienstag, M.J., Alter M.J., Stevens, C.E., Tegtmeier, G.E., Bonino, F., Colombo, M., Lee, W.S., Kuo, C., Berger, K., Shuster, J.R., Overby, C.R., Bradley, D.W. and Houghton, M. (1989). An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non A non B hepatitis. *Science* 244: 362-364.
- Lazizi, Y., Elfassi, E. and Pilot, J. (1992). Detection of Hepatitis C Virus sequence in sera with controversial serology by Nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* 30(4): 931-934.
- Mabilat, C. and Courvalin, P. (1990). Development of "oligotyping" for characterization and molecular epidemiology of ten beta lactamases in Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, AAC: 230-290.
- Miotti, P.G., Eiden, J. and Yolken, R.H. (1985). Comparative efficiency of commercial immunoassays for the diagnosis of rotavirus gastroenterites during the course of infection. *J. Clin. Microbiol.* 22: 693-698.
- Miyakawa, Y., Mabuchi, T., Kagaya, K. and Fukazawa, Y. (1992). Isolation and characterization of a species-specific DNA fragment for detection of *Candida albicans* by PCR. *J. Clin. Microb.* 30(4): 894-900.
- Mullis, K.B. and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA "in vitro" via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 55: 335-350.
- Ounissi, H., Derlot, E., Carrier, C. and Courvalin, P. (1990). Gene homogeneity for aminoglycoside modifying enzymes in gram positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34: 2164-2168.
- Pao, C.C., Yen, T.S.B., You, J.B., Maa, J.S., Fiss, E.H. and Chang C.H. (1990). Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1877-1880.

- Park, C.H., Hixon, D.L., Ferguson, C.B., Hall, C.L., Risheim, C.C., Cook, C.B. (1984). Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automated radiometric technic. *Am. J. Clin. Pathol.* 81: 341-345.
- Royfield, M., De Cock, K., Heyward, W. (1988). Mixed human HIV infection in an individual: demonstration of both HIV type 1 and type 2 proviral sequences by using PCR. *J. Infect. Dis.* 158: 1170-1176.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F. (1985). Enzymatic amplification of beta globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 : 1350-1354.
- Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1986). Analysis of enzymatically amplified beta globin and HLA- DQ alfa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature (London)*: 324: 163-166.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higushi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer- directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-490.
- Sarkar, G. and Sommer, S. (1990). Shedding light on PCR contamination. *Nature (London)* 343:27
- Schrifer, M.E., Saccijn, J.B., Wirtz, R.A. and Azad, A.F. (1991). Detection of PCR-amplified malarial DNA in infected blood and individual mosquitoes. *Exp. Parasitol.* 73: 311-316.
- Shankar, P., Manjunath, N., Mohan, K.K., Prasad, K., Shriniwas, M.B. and Aheya, G.K. (1991). Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by PCR. *Lancet* 337: 5-7.
- Sönnerborg, A., Abens, J., Johansson, B. and Strannegard, O. (1990). Detection of HIV-1 by PCR and virus cultivation. *J. Med. Virol.* 31: 234-240.
- Soriano, V., Hewlett, I., Tor, J., Clotet, B., Epstein, J., Foz, M. (1990). Silent HIV infection in heterosexual partners of seropositive drug abusers in Spain. *Lancet* 1: 860-861
- Sun, C.F., Pao, C.C., Wu, S.Y. and Liaw, Y.F. (1988). Screening for hepatitis B virus in healthy blood donors by molecular DNA hybridization analysis. *J. Clin. Microb.* 26: 1848-1852.
- Takahashi, K., Imai, M., Tsuda, F., Takahashi, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1976). Association of dane particles with antigen in the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.* 117: 102-105.

- Vilgalys, R. and Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172: 4238-4246.
- Watson, J.D. and Gilman, M. (1992) The polymerase chain reaction. In *Recombinant DNA -Second Edition -Scientific American Books* 79-95.
- White, T.J., Madej, Roberta and Persing, D.H. (1992). The Polymerase Chain Reaction: clinical applications. *Advances in Clinical Chemistry* 29: 161-196.
- Wilde, J., Eiden, J. and Yolken, R. (1990). Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for the detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 28(6): 1300-1307.
- Williams, S.D. and Kwok, S. in *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*, E.H. Lennette, Ed. (Dekker, New York, 1991), 147-173.
- Wong, D.C., Diwan, A.R., Rosen, L., Gerin, J.L., Johnson, R.G., Polito, A. and Purcell, R.H. (1990). Non specificity of anti HCV test for seroepidemiological analysis. *Lancet* 336: 750-751.