

M

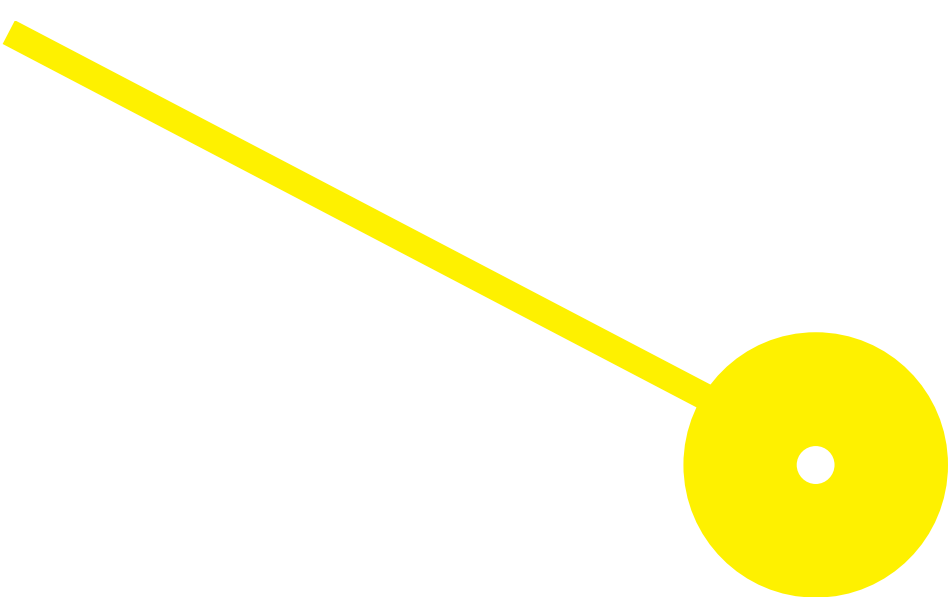
MESTRADO

Em Análises Clínicas e Saúde Pública- Microbiologia e Saúde Pública

# Aplicação da Biologia Molecular, na identificação e caracterização de doenças infecciosas: Identificação de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* em amostras de sangue

Débora Raquel Andrade Gonçalves

07/2020





**Aplicação da Biologia Molecular, na identificação e caracterização de doenças infecciosas:  
Identificação de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* em amostras de sangue**

**Autor**

Débora Raquel Andrade Gonçalves

**Orientadores**

Professor Doutor | Sandra Marlene Silva Mota | ESS-PPorto

Professor Especialista | Maria Manuela Amorim Silva e Sousa | ESS-PPorto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública** – Área de Especialização em **Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## Agradecimentos

A Deus, que me deu a vida e que se fez presente nesta caminhada, fazendo-me concretizar este sonho.

Aos meus pais, pelo amor e pelo incentivo por estarem sempre presentes, possibilitando-me chegar ao que hoje conquisto.

Aos meus irmãos pela amizade e carinho sempre demonstrados.

Às professoras orientadoras, pessoas e profissionais que muito admiro, por sempre fazerem-se presentes no decorrer do ano letivo e, pelos momentos que me foram dedicados.

Às supervisoras Dr.<sup>a</sup> Maria Joana Sobrinho Simões, Assistente Graduado Sénior CHUSJ, e da Dr.<sup>a</sup> Maria do Rosário Santos Silva Costa, TSDT de Análises Clínicas e Saúde Pública do CHSJ pela disponibilidade e orientação.

À colega e técnico superior de diagnóstico e terapêutica Silvia Conde que acompanhou meu estágio, contribuindo no processo de aprendizagem através da troca de saberes.

## Resumo

As doenças infecciosas são distúrbios no corpo humano, provocados por agentes infecciosos ou por toxinas por eles produzidas. Estas infeções têm tido um impacto crescente e conseqüente preocupação nas populações a nível mundial.

A reemergência e, principalmente, o aparecimento de novas doenças transmissíveis é um constante desafio para a saúde pública. Pelo facto, é importante a existência de instituições que atuam de forma integrada nos sistemas de saúde no combate das doenças infecciosas. O Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ), presta assistência em várias áreas clínico-laboratoriais, nomeadamente na área da microbiologia clássica e molecular, e é centro de referência para os distritos do Porto, Braga e Viana do Castelo.

O presente relatório tem por base o estágio decorrido num período de 4 meses, realizado no laboratório de Biopatologia Molecular do CHUSJ. Tem como objetivo principal: desenvolver conhecimentos e competências na vertente clínico-laboratorial nas tecnologias e metodologias utilizadas para o diagnóstico molecular de microrganismos infecciosos.

Na primeira parte deste trabalho serão descritas as atividades realizadas ao longo do referido estágio que incluiu a participação na rotina clínico-laboratorial de métodos e técnicas utilizados no diagnóstico molecular. Neste contexto, foram realizados os protocolos desde a preparação de amostras, extração de ácidos nucleicos, amplificação, deteção e quantificação. Na segunda parte, expõe-se o estudo de caso clínico, onde foi feita a deteção da *Pneumocystis jirovecii* a partir de amostras de sangue. Nesta secção é feita a caracterização do microrganismo, quanto à epidemiologia, morfologia e ciclo de vida, manifestações clínicas, grupos de risco e as formas de diagnóstico. Tendo por base a aplicação das técnicas de biologia molecular, foi explorada a possibilidade de deteção do microrganismo alvo, em amostras de soro e os resultados foram comparados com os das amostras respiratórias previamente analisadas.

Conclui-se que o estágio realizado foi muito importante e, os objetivos de aprendizagem foram cumpridos através das atividades realizadas. O relato de casos de diagnóstico clínico-laboratorial de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* em amostras derivadas de sangue, ainda que tenha tido constrangimentos, é o início de um estudo que merece ter continuidade, já que poderá ser um método mais rápido e menos invasivo para o diagnóstico desta infeção.

**Palavras-chave:** Ácidos nucleicos, PCR, *Pneumocystis jirovecii*, Soro

## **Abstract**

Infectious diseases are disorders of the human body caused by an infectious agent or the toxins they produce. These infections have had an increasing impact and consequent concern on populations worldwide.

The re-emergence and, especially, the appearance of new communicable diseases is a constant challenge for public health. Therefore, it is important to have institutions that act in an integrated way in the health systems to fight infectious diseases. The Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ), provides assistance in several clinical and laboratory areas, namely in the area of classical and molecular microbiology, and it is a reference center for the districts of Porto, Braga and Viana do Castelo.

The present report is based on the internship that took place over a period of 4 months, at the CHUSJ Molecular Biopathology laboratory. Its main purpose is to develop knowledge and skills in the clinical and laboratory side of the technologies and methodologies used for the molecular diagnosis of infectious microorganisms.

The first part of this work describes the activities carried out during this internship, which included the participation in the clinical and laboratory routine of methods and techniques used in molecular diagnosis. In this context, protocols were performed from sample preparation, nucleic acid extraction, amplification, detection and quantification. In the second part, the clinical case study is exposed, in which the detection of *Pneumocystis jirovecii* from blood samples was performed. In this part, the microorganism is characterized in terms of epidemiology, morphology and life cycle, clinical manifestations, risk groups and forms of diagnosis. Based on the application of molecular biology techniques, the possibility of detecting the target microorganism in serum samples was explored and the results were compared with those of previously analyzed respiratory samples.

It was concluded that the internship performed was very important and the learning objectives were met through the activities performed. The report of cases of clinical and laboratorial diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in blood-derived samples, despite the constraints, represents the beginning of a study that is worthy of being continued, since it could be a faster and less invasive method for the diagnosis of this infection.

**Keywords:** Nucleic acids; PCR, *Pneumocystis jirovecii*, Serum

## Résumé

Les maladies infectieuses sont des troubles du corps humain causés par un agent infectieux ou par des toxines produites par celui-ci. Ces infections ont eu un impact croissant et, par conséquent, une préoccupation majeure au niveau mondial. La réémergence et, surtout, l'apparition de nouvelles maladies transmissibles est un défi constant pour la santé publique. Par ailleurs, il est important d'avoir des institutions de santé pour lutter contre ces maladies infectieuses. Le Centre hospitalier universitaire de São João (CHUSJ) qui fournit une assistance dans plusieurs domaines cliniques, notamment dans le domaine de la microbiologie classique et moléculaire, est un centre de référence pour les districts de Porto, Braga et Viana do Castelo. Le présent rapport décrit le stage qui s'est déroulé sur une période de 4 mois au laboratoire de biopathologie moléculaire du Centre Hospitalier Universitaire de São João, EPE. Son principal objectif était de développer les connaissances et les compétences dans le domaine clinique-laboratoire, en particulier dans les technologies et méthodologies utilisées pour le diagnostic moléculaire des microorganismes infectieux. Tout au long de ce travail et dans une première partie seront décrites les activités réalisées au cours de ce stage y compris la participation à la routine clinique-laboratoire, notamment les méthodes et techniques utilisées dans le diagnostic moléculaire. Dans ce contexte, tous les protocoles de préparation des échantillons, d'extraction des acides nucléiques, d'amplification, de détection et de quantification ont été réalisés. Dans la deuxième partie, est présentée l'étude de cas clinique, le *Pneumocystis jirovecii* détecté à partir d'un échantillon de sang. Dans cette section, est faite la caractérisation du microorganisme, notamment l'épidémiologie, la morphologie et le cycle de vie, les manifestations cliniques, les groupes à risque et les formes de diagnostic. Sur la base de l'application de techniques de biologie moléculaire, il a été analysé, la possibilité de détecter le microorganisme cible dans des échantillons de sérum et les résultats ont été comparés à ceux des échantillons respiratoires précédemment analysés. Il a été conclu que le stage effectué a été d'une capitale importance, étant donné que les objectifs d'apprentissage ont été atteints grâce aux activités réalisées. L'information concernant les cas de diagnostic clinique-laboratoire de la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii* dans des échantillons de sang, bien qu'il ait eu des contraintes, constitue le début d'une étude qui devrait avoir sa continuité, car il pourrait être une méthode plus rapide et moins invasive pour le diagnostic de cette infection.

**Mots clés :** Acides nucléiques, PCR, *Pneumocystis jirovecii*, Sérum

## Índice

1.	Instituição e Contextualização do estágio.....	1
1.1.	Caracterização do laboratório .....	1
1.2.	Objetivo do Estágio.....	1
2.	Diagnóstico Molecular em Microbiologia Clínica: Atividades do laboratório de Biopatologia Molecular .....	3
2.1.	Princípios teóricos de extração de DNA e RNA .....	3
2.1.1.	Metodologias para extração de DNA e RNA de acordo com o tipo de amostra.....	5
2.1.1.1	Urina.....	6
2.1.1.2	Amostras respiratórias.....	6
2.1.1.3	Sangue.....	7
2.1.1.4	Líquido cefalorraquidiano.....	7
2.1.1.5	Biópsias .....	7
2.1.1.6	Biópsias parafinada .....	7
2.1.1.7	Zaragatoas .....	7
2.1.1.8	Líquidos Biológicos .....	8
2.1.1.9	Medula Óssea.....	8
2.1.1.10	Fezes.....	8
2.2.	Princípios teóricos e procedimentos de Amplificação dos Ácidos Nucleicos.....	8
2.2.1.	PCR clássica.....	9
2.2.2.	PCR em tempo real.....	12
2.2.3.	Variantes da PCR.....	14
2.2.3.1	Análise dos resultados da reação .....	15
2.3.	Controlo de qualidade interno e externo.....	18
3.	Estudo de caso: Identificação de pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> em amostras de sangue .....	21
3.1.	Contextualização.....	21
3.1.1.	<i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	21
3.1.2.	Epidemiologia.....	22
3.1.3.	Morfologia e Ciclo de Vida .....	23
3.1.4.	Grupos de Risco.....	25
3.1.5.	Manifestações Clínicas.....	26
3.1.6.	Diagnóstico.....	27
3.2.	Metodologia.....	28
3.3.	Resultados e Discussão.....	30
4.	Conclusão.....	34
	Referências Bibliográficas .....	35
	Anexo.....	43

## Lista de Siglas e Abreviações

<b>CHUSJ</b>	Centro Hospitalar e Universitário de São João
<b>DGS</b>	Direção Geral de Saúde
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleósidos trifosfatos, do inglês <i>deoxyadenosine triphosphate</i>
<b>EQA</b>	Avaliação de Qualidade Externa, do inglês <i>External Quality Assessment</i>
<b>GMS</b>	Coloração de Metenamina de prata de Grocott-Gomori <i>Grocott-Gomori methenamine silver</i>
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>INSA</b>	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
<b>PNVG</b>	Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe
<b>LBA</b>	Líquido de lavagem broncoalveolar
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquidiano
<b>QCMD</b>	Controle de Qualidade para Diagnóstico Molecular, do inglês <i>Quality Control for Molecular Diagnostics</i>
<b>UK-NEQAS</b>	Programa de Controlo de Qualidade Externo do Reino Unido, do inglês <i>United Kingdom National External Quality Assurance Scheme</i>
<b>SARS-CoV-2</b>	síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 do Inglês: <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
<b>PCP ou PcP</b>	Pneumocystis Pneumonia
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da Polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PK</b>	Proteinase K
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, do inglês, <i>ribonucleic acid</i>
<b>Real-time PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
<b>RT-PCR</b>	PCR de transcriptase reversa, do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de imunodeficiência adquirida
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>single nucleotide polymorphism</i>
<b>Taq polimerase</b>	DNA-polimerase termo estável
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>Tm</b>	Temperatura de fusão do inglês <i>melting temperature</i>
<b>FRET</b>	Transferência de energia por ressonância de fluorescência do inglês <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Magnésio
<b>ITSs</b>	espaçadores internos transcritos do inglês <i>internal transcribed spacers. Related</i>
<b>mt</b>	rRNA mitocondrial do inglês <i>mitochondrial rRNA</i>
<b>DHFR</b>	di-hidrofolato redutase do inglês <i>dihydrofolate reductase</i>
<b>TS</b>	timididase sintase do inglês <i>thymidylate synthase</i>

## **Índice de Imagens**

<i>Figura 1 Diagrama ilustrativo das etapas de cada ciclo.....</i>	<i>11</i>
<i>Figura 2 Corante fluorescente–SYBR Green, intercalam inespecificamente à dupla hélice de DNA formado durante a amplificação, emitindo fluorescência quando irradiadas.....</i>	<i>12</i>
<i>Figura 3 Sondas Oligonucleotídica. (A) Sonda TaqMan; (B) Sonda Molecular Beacon .....</i>	<i>13</i>
<i>Figura 4 Sondas FRET–Fluorescence Resonance Energy Transfer.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 5 Esquema ilustrativo do NESTED PCR.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 6 Gráfico de emissão de fluorescência, com a representação das fases da amplificação.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 7 A) Gráfico ilustrativo da Temperatura de Melting B) Gráfico da Curva de Melting.....</i>	<i>17</i>
<i>Figura 8: Ciclo de vida sexuada.....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 9 – Procedimento de Extração de Ácidos Nucleicos.....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 10 Curva de amplificação e Curva de Melting do Utente nº3.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 11 Curva de amplificação e Curva de Melting.....</i>	<i>31</i>

## **Índice de Tabelas**

<i>Tabela 1 Preparação da reação de amplificação.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabela 2 Síntese dos resultados obtidos.....</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 3 Sensibilidade e Especificidade da pesquisa do DNA no soro no diagnóstico de PcP. Tabela adaptada do Diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia with serum cell- free DNA in non-HIV-infected immunocompromised patients, 2017.....</i>	<i>32</i>

## **1. Instituição e Contextualização do estágio**

O presente trabalho surge no âmbito da unidade curricular de Estágio do Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública, ramo de Microbiologia e Saúde Pública. O Estágio curricular foi realizado no Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ), que é um dos hospitais universitários da cidade do Porto, com ligação à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. O estágio foi realizado no laboratório de Biopatologia Molecular, do Serviço de Patologia Clínica deste hospital.

Este relatório tem como foco descrever e evidenciar o trajeto de aprendizagem realizado ao longo da prática clínico-laboratorial. O seu ponto central é a aplicação dos métodos de biologia molecular, destacando a sua importância no diagnóstico de doenças infecciosas, assim como analisar a vantagem da rapidez dos resultados, conjugada com a elevada sensibilidade e especificidade.

### **1.1. Caracterização do laboratório**

O laboratório de Biopatologia Molecular, do CHUSJ, tem como funções a pesquisa e identificação de agentes infecciosos permitindo assim melhorar o apoio ao diagnóstico e tratamento de forma mais precisa e rápida. Esta melhoria é possível graças à especialização deste serviço na aplicação de meios complementares de diagnóstico, designadamente no âmbito da biologia molecular.

O laboratório de Biopatologia Molecular está fisicamente separado em três áreas. Na primeira realiza-se o processamento das amostras biológicas, para a extração dos ácidos nucleicos. Na segunda é realizada a preparação dos reagentes para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Por último, na terceira área é realizada a reação de PCR em tempo real, nos termocicladores, bem como análise pós-PCR. Essa divisão física em diferentes áreas é de extrema importância, de forma a evitar contaminações cruzadas, e assim manter a qualidade dos resultados obtidos pelo serviço (1).

### **1.2. Objetivo do Estágio**

O estágio teve como objetivo geral desenvolver conhecimentos e competências na vertente clínico-laboratorial nas tecnologias e metodologias utilizadas para o diagnóstico molecular de microrganismos infecciosos e como objetivos específicos: i) compreender os princípios das tecnologias e metodologias de diagnóstico molecular em Microbiologia Clínica a partir das diferentes técnicas de extração de DNA e RNA, de acordo com o tipo de amostra, bem como descrever os métodos de identificação molecular de microrganismos em amostras biológicas aplicando a técnica de PCR em tempo real; ii) analisar os resultados de estudo de amostras com suspeita de presença de microrganismos potencialmente

infecioso; iii) realizar e integrar a rotina clínico-laboratorial; iv) compreender e aplicar a metodologia de validação de resultados.

O principal objetivo deste relatório de estágio é descrever todas as atividades que foram realizadas durante o estágio curricular bem como iniciar a implementação de um protocolo para identificar *Pneumocystis jirovecii* em amostras de sangue.

## **2. Diagnóstico Molecular em Microbiologia Clínica: Atividades do laboratório de Biopatologia Molecular**

A biologia molecular é o ramo da biologia que abrange especialmente as áreas de bioquímica e genética. Esta ciência concentra-se nos estudos das interações entre DNA, RNA, proteínas e sua biossíntese. O desenvolvimento da biologia molecular tem sido aplicado ao diagnóstico microbiológico, baseado em diferentes técnicas, cujo objectivo é pesquisar e identificar microrganismos potencialmente patogénicos para o ser humano, complementando o diagnóstico microbiológico clássico. A abordagem molecular permitiu aumentar a sensibilidade, a especificidade, bem como reduzir o intervalo de tempo entre a suspeita clínica e a identificação do agente infeccioso (2).

### **2.1. Princípios teóricos de extração de DNA e RNA**

As técnicas de extração e purificação de ácidos nucleicos a partir de amostras biológicas, têm sido amplamente utilizadas em estudos moleculares, devido à sua facilidade em amplificar *in vitro* as regiões específicas do genoma de qualquer organismo (3).

Antes do desenvolvimento destas técnicas, a separação de ácidos nucleicos era muito trabalhosa, com a desvantagem de obter baixos rendimentos e baixa pureza dos produtos de extração. Com a evolução tecnológica aplicada à biologia molecular foi possível a automatização de procedimentos laboratoriais, podendo deste modo a resposta laboratorial ser dada em grande escala e com resultados válidos.

Após a década de 1970, a extração de ácidos nucleicos por partículas magnéticas tornou-se numa técnica em plena ascensão, que utiliza o magnetismo, aliados a um sistema tampão apropriado, para a separação eficiente de partículas biologicamente ativas a partir de extratos celulares brutos, combinada a uma eficiência e rapidez da purificação considerada ideal (4).

A aplicação das técnicas acima mencionadas na extração de ácidos nucleicos consiste na aplicação de dois princípios básicos: o primeiro é a lise das células presentes na amostra e o segundo a purificação do ácido nucleico. Após a lise celular, o ácido nucleico é separado dos restos celulares, tais como proteínas, carboidratos, entre outros, e logo de seguida é precipitado e suspenso num volume adequado de água ultrapura ou soluções-tampão de eluição (5). O ácido nucleico extraído pode passar por processos de concentração e de purificação, com o objetivo de obter melhores resultados no ensaio de PCR. De uma forma geral os protocolos de extração dos ácidos nucleicos têm por base 4 etapas essenciais: 1) lise celular com proteinase K, 2) Precipitação do ácido nucleico, 3) Lavagem de ácidos nucleicos, e 4) Eluição de ácidos nucleicos purificados.

A proteinase K (PK), serina protease capaz de digerir queratina, tem uma temperatura ótima de atuação a 56°C. Esta proteinase permanece ativa na presença de desnaturantes de proteínas, tornando-se muito

útil para a degradação de proteínas que poderiam contaminar misturas de ácidos nucleicos (6). Nesta primeira etapa de lise celular, o uso de PK é fundamental para salvaguardar a eliminação de DNases, RNases e proteínas das preparações de ácidos nucleicos. O processo de degradação celular e exposição do material genético dos microrganismos nas amostras é realizada a elevada temperatura sob condições altamente desnaturantes. A combinação de proteinase K e tampão de lise garantem a digestão das proteínas do revestimento viral, na extração de ácidos nucleicos de vírus, e a inativação das RNases (7). A segunda etapa de isolamento do ácido nucleico pode ser feita por diferentes métodos, com eficiência e complexidade distintas, e divididos em dois grupos: os métodos não magnéticos ou clássicos e os métodos magnéticos.

No grupo dos métodos não magnéticos, é conhecido o isolamento de ácidos nucleicos por fase fluida que consiste numa série complexa de precipitação e etapas de lavagem. Este método requer a lise do material biológico por um detergente ou substância caotrópica, na presença de enzimas de degradação de proteínas, seguido de várias etapas com solventes orgânicos como fenol e / ou clorofórmio ou etanol, que em geral são altamente tóxicos e requerem eliminação especial dos resíduos. Estes procedimentos tornam o método demorado, laborioso e dispendioso (4,8).

Ainda nos métodos não magnéticos existe o isolamento em fase sólida, que tem como exemplo a extração de fragmentos de DNA de amostras biológicas em matriz de sílica (4). As principais descobertas de Boom e Salimans *et al*, 1990 relataram que a ligação de fragmentos de DNA nas superfícies das matrizes de sílica pode ser controlada na presença de determinada concentração de sais e sob certas condições de pH (8). De igual modo estudos realizados pelo *Institute of Medical Microbiology, University Hospital*, na Alemanha, em 2001 comprovaram a ligação do DNA às membranas de sílica num ensaio de PCR, o que representa um passo significativo na melhoria da metodologia (9).

O método magnético, por sua vez, apresenta mais vantagens em relação aos métodos tradicionais que se baseiam em centrifugações e filtração (10). Trata-se efetivamente de uma forma rápida, simples e eficiente de separar as partículas, para além de ser muito menos trabalhoso comparativamente às técnicas tradicionais. Este método revela-se também mais ecológico, uma vez que os produtos tóxicos tais como fenol e o clorofórmio não são usados (1,8). Trabalhos desenvolvidos usando microesferas magnéticas de resina de ureia-formaldeído e microesferas de sílica magnética para extrair o DNA genómico humano mostraram ser eficazes (11). Neste método o material genético pode ser facilmente removido pela aplicação de um campo magnético.

A terceira etapa dos protocolos de extração é a lavagem dos ácidos nucleicos. Estes estando ligados às partículas magnéticas ou à membrana de sílica nos métodos não magnéticos, são lavados com uma sequência de tampões de lavagem apropriados. Essas condições de lavagem garantem a remoção completa de qualquer contaminante residual sem afetar a ligação ao DNA. Esta etapa tem o objetivo de melhorar significativamente a pureza do DNA eluído (3,5).

Na última etapa os ácidos nucleicos altamente purificados são eluídos num tampão de eluição ou em água ultrapura. Neste ponto os ácidos nucleicos purificados podem ser usados imediatamente em aplicações a jusante ou armazenados para uso futuro (7).

No mercado estão disponíveis kits comerciais que fornecem métodos rápidos e fáceis para a purificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) (12).

No laboratório de Biopatologia Molecular no CHUSJ, o kit usado para extração de ácidos nucleicos em fase sólida é o QIAamp DNA Mini Kit, QIAamp Stool DNA, QIAamp Viral Kit da Qiagen® (12). No protocolo as condições de tamponamento do lisado são ajustadas para permitir a ligação ideal do DNA à membrana. O DNA é adsorvido na membrana de sílica QIAamp durante uma breve centrifugação ou etapa de vácuo. As condições de sal e pH no lisado garantem que proteínas e outros contaminantes, que podem inibir a PCR e outras reações enzimáticas a jusante, não sejam retidos na membrana QIAamp (12). Neste laboratório é utilizada também a metodologia de extração magnética de ácidos nucleicos através do uso do Mini Kit EZ1 Vírus v2.0, Mini Kit EZ1 Blood, Mini Kit EZ1 tissue (7) da Qiagen® para purificação automatizada de DNA e RNA viral. No protocolo o tampão de ligação é adicionado às amostras lisadas para ajustar as condições de ligação. Uma vez a amostra completamente lisada é misturada com partículas magnéticas, para permitir uma ótima adsorção dos ácidos nucleicos virais e DNA bacteriano na superfície da sílica. As condições de sal e pH garantem que as proteínas e outros contaminantes capazes de inibir a PCR, não estejam ligados às partículas magnéticas (7).

### **2.1.1. Metodologias para extração de DNA e RNA de acordo com o tipo de amostra**

Na prática clínico-laboratorial é importante a seleção e o planeamento das metodologias a adotar. Para isso, o conhecimento das características dos microrganismos potencialmente previsíveis, nomeadamente, as suas especificidades, bem como a amostra mais adequada a usar, é fundamental, para que se obtenha resultados fiáveis.

Atendendo a que no mercado existem vários protocolos de extração de DNA e RNA, aquando da seleção da metodologia, deve-se atender a alguns parâmetros, a saber: a molécula (DNA ou RNA) que se deseja extrair, o tipo de amostra com que se vai trabalhar, o grau de pureza e o rendimento desejado da extração, bem como os recursos necessários para a sua realização.

No âmbito do estágio, no laboratório de Biopatologia Molecular do CHUSJ, os equipamentos de extração de DNA e RNA e os *kits* usados são da marca Qiagen®. São usados dois equipamentos distintos, o EZ1 Advance® que usa a tecnologia de partículas magnéticas para purificação de DNA e RNA viral e DNA bacteriano. Permite a purificação de ácidos nucleicos de alta qualidade, livres de proteínas, nucleases e

outras impurezas. O Qiacube® é outro equipamento que usa a tecnologia de membrana de sílica para o isolamento e a purificação de ácidos nucleicos.

As amostras admitidas neste serviço, para pesquisa de microrganismos potencialmente responsáveis pela infecção podem ser: urina, amostras respiratórias, sangue, líquido cefalorraquidiano, material proveniente de biopsias, amostras colhidas em zaragatoa, líquidos biológicos, medula óssea, fezes, biópsias parafinadas, e amostra de sangue impregnado em cartão de Guthrie. A listagem de microrganismos pesquisados no laboratório de Biopatologia Molecular do CHUSJ, encontra-se no anexo 1 e 2. De acordo com o tipo de microrganismo que se pretende pesquisar e o tipo de amostra é realizado um pré-tratamento da amostra previamente à extração de ácidos nucleicos.

### **2.1.1.1 Urina**

Para a pesquisa de bactérias e vírus na urina, esta tem de ser concentrada por centrifugação, respeitando as rotações e tempos específicos pré-definidos, cumprindo-se assim a primeira etapa do pré-tratamento. A segunda etapa consiste na adição da proteinase K juntamente com o tampão de proteção (tampão G2) incluído no *kit* comercial, ao *pellet* obtido. Seguidamente é colocado em banho seco a 56°C (temperatura ideal de atuação da proteinase). A terceira e última etapa consiste na extração dos ácidos nucleicos utilizando o equipamento de extração (EZ1 Advance®) e o *kit vírus mini v2.0*® (7). Dependendo do tipo de microrganismo a pesquisar, e as variações subjacentes, deve seguir o protocolo conforme o anexo 3.

### **2.1.1.2 Amostras respiratórias**

São designadas de amostras respiratórias as secreções brônquicas, lavado brônquico, lavado brônquico alveolar e líquido pleural. O pré-tratamento deste tipo de amostra tem como primeira etapa a fluidificação a partir da adição de n-l-cisteína a 2%, que atua sobre a amostra por um período de aproximadamente de 10 minutos, à temperatura ambiente com agitação periódica até que a amostra esteja completamente liquefeita. Esta etapa é comum à pesquisa de qualquer microrganismo. Posteriormente, é submetida à centrifugação seguindo-se a digestão do *pellet* obtido ao qual se adiciona o tampão G2 e a proteinase K e levado a banho seco a 56° C. De acordo com o microrganismo a pesquisar, existem variações, conforme expresso no anexo 4.

### **2.1.1.3 Sangue**

A pesquisa de agentes patogénicos a partir de amostras de sangue está dependente das características de cada microrganismo, sendo os protocolos adaptados de forma a obter o melhor rendimento. Neste sentido, uma etapa fundamental é o pré-tratamento das amostras de sangue, descrita anexo 5.

### **2.1.1.4 Líquido cefalorraquidiano**

Quando se pretende pesquisar microrganismos em amostras de líquido cefalorraquidiano, é feita a extração direta de uma quantidade de amostra, seguindo o protocolo descrito no anexo 6.

### **2.1.1.5 Biópsias**

As amostras mais frequentes são as biópsias intestinais, do cólon, cerebral, ganglionar, pulmonar, pleural e cutânea. O primeiro passo do pré-tratamento comum à pesquisa de vários microrganismos, é a fragmentação da biópsia com bisturi. Seguidamente a amostra é degradada por mecanismos térmicos para romper as células. O anexo 7 apresenta as etapas a realizar na pesquisa de cada microrganismo.

### **2.1.1.6 Biópsias parafinada**

Para o processamento de biópsia parafinada é necessário retirar pequenas porções da amostra, com a ajuda de um bisturi. Depois de adicionar Xilol, que tem por função dissolver a parafina, as amostras são centrifugadas a 1300 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante é rejeitado e adiciona-se o etanol, que é incubado durante 5 minutos à temperatura ambiente. Seguidamente, a amostra é novamente centrifugada a altas rotações por 5 minutos, rejeita-se o sobrenadante e deixa-se o etanol evaporar. Depois é realizado o processo de digestão com a proteinase K levando a banho seco a 56°C. Após a lise completa, incuba-se a amostra durante 1 hora em banho seco a 90°C. Por fim, a extração de ácidos nucleicos é feita no QiAcube® selecionando o protocolo de biópsias parafinadas.

### **2.1.1.7 Zaragatoas**

Os produtos biológicos colhidos por zaragatoa podem ser de pus, exsudado genital, de lesão cutânea, ganglionar entre outros. Para a pesquisa de vírus, bactérias ou de parasitas, é necessário a digestão da amostra com a proteinase K, juntando também um tampão estabilizador, que é levado a banho seco a 56°C por 15 minutos, conforme expresso no anexo 8.

### **2.1.1.8 Líquidos Biológicos**

Os principais líquidos biológicos usados na pesquisa de microrganismos são: líquidos pleurais, pericárdico, peritoneal, biliar, articular e sinovial. Caso a amostra apresente fibrina o primeiro passo do pré-tratamento é a fluidificação da amostra com n-l-cisteína a 2%, deixando-se atuar durante 15 minutos. De seguida é centrifugado por 15 minutos a 3 000 rpm. Se não apresentar fibrina é apenas centrifugado. O segundo passo consiste na digestão da amostra com a proteinase K. É submetida a banho seco a 56°C até ficar fluidificada. A extração de ácidos nucleicos dos vírus é realizada no equipamento EZ1 Advance® selecionando o protocolo de vírus, enquanto que para as bactérias o protocolo usado é o de DNA de tecidos. As variações dos passos do protocolo estão identificadas no anexo 9.

### **2.1.1.9 Medula Óssea**

Para a pesquisa de bactérias e fungos é necessário lisar os eritrócitos/eritroblastos com água durante 15 minutos aproximadamente. Posteriormente, a amostra é sujeita a centrifugação durante 15 minutos a 3.000 rpm. As bactérias são incubadas em banho seco a 56°C, com a proteinase K. A extração de DNA é feita no equipamento EZ1 Advance® com o protocolo de DNA de tecidos. No caso das *Mycobacterium tuberculosis*, devem ser realizadas etapas extra, conforme expresso no anexo 10. Na pesquisa da presença de fungos, além das etapas comuns, a amostra deve ser incubada a 37°C durante 45 minutos com liticase antes de ser digerida.

### **2.1.1.10 Fezes**

Para pesquisa de bactérias a partir de amostras de fezes, o pré-tratamento da amostra consiste numa série de suspensões, centrifugações e mecanismos térmicos para lisar as células, detalhado no anexo 11. Enquanto que para a pesquisa de vírus a extração é feita a partir do sobrenadante da amostra. Para a pesquisa de fungos após os primeiros passos, é necessário fazer a incubação do sobrenadante da amostra com liticase a 37°C por 45 minutos.

## **2.2. Princípios teóricos e procedimentos de Amplificação dos Ácidos Nucleicos**

A identificação de microrganismos patogénicos a partir de metodologias moleculares tem por base as características genotípicas, contrariamente à microbiologia convencional, em que a identificação é feita com base nas características fenotípicas expressas. Todos os microorganismos apresentam semelhanças a nível molecular pois todas as células, das mais simples às mais complexas dependem de

um conjunto de biomoléculas universais, para o seu normal funcionamento. Os ácidos nucleicos são os elementos chave na descodificação e transmissão da informação genética, sendo estes os protagonistas das metodologias de diagnóstico molecular (13).

### 2.2.1. PCR clássica

Em meados dos anos 80, Kary Mullis e colaboradores desenvolveram a técnica de PCR. Em 1985, através da pesquisa científica intitulada "*Enzymatic Amplification of  $\beta$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia*" (14), projetaram dois novos métodos, que foram utilizados para estabelecer um teste de diagnóstico pré-natal rápido e altamente sensível à anemia falciforme. Um desses métodos consistia na amplificação enzimática do DNA genómico da beta-globina mediada por sequências de primers específicas (14). Pelo facto foi premiado em 1993 com o premio Nobel de Química (15). Esta técnica é aplicável numa variedade de estudos, nomeadamente na clonagem de cDNA e DNA genómico e alotipagem (16), na análise de expressão genética, análise de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), bem como na análise de aberrações cromossómicas (15).

A PCR tem como princípio básico obter um elevado número de cópias de uma sequência específica do ácido nucleico alvo (13). Esta técnica tem evoluído rapidamente e tem sido aplicada à deteção dos agentes etiológicos responsáveis pelas doenças infecciosas. A tecnologia de PCR introduziu vantagens na microbiologia clínica, por ser um método com maior especificidade, sensibilidade e economicamente mais vantajoso. Permite também diminuir o tempo de resposta na identificação do agente, evitando-se ter de aguardar pelo crescimento das culturas microbianas o que acontece no diagnóstico laboratorial por microbiologia clássica. Permite ainda evitar os riscos associados à manipulação de grandes quantidades de microrganismos patogénicos (13), uma vez que o DNA de interesse pode ser amplificado a partir de uma única célula, possibilitando a amplificação *in vitro* de números extremamente pequenos de uma sequência de DNA relevante (16). Contudo, existem algumas desvantagens, como a possibilidade de contaminações e a inibição por vários produtos químicos presentes na reação (proteínas, hemoglobina, detergentes iónicos, heparina, polianióes, corantes de carregamento de gel) (16).

A reação de PCR envolve uma série de passos alternados de aquecimento e arrefecimento da mistura de PCR (13), os quais ocorrem ao longo de vários ciclos. Para que haja a determinação do número de ciclos, existem dois fatores importantes: o número de cópias do DNA molde presente no início da reação e a eficiência da extensão e amplificação (16).

Para a realização da reação de PCR é necessário a presença de seis elementos fundamentais que compõem a mistura da reação- Master Mix, são estes a cadeia de DNA/ RNA alvo, os primers, DNA-polimerase termoestável, desoxinucleósidos trifosfatos -dNTPs, ião magnésio e o tampão.

O primeiro elemento da Master Mix é a cadeia de DNA/RNA alvo que pode ser de cadeia simples ou dupla (15). O segundo elemento são pequenos oligonucleótidos iniciadores da reação de polimerase- os primers. Para ter sucesso na realização da reação de PCR, o desenho dos primers deve seguir algumas diretrizes já descritas na literatura, para evitar que o resultado final de uma reação seja de pouco ou nenhum produto, devido à amplificação inespecífica ou então por formação de dímeros de primers. O comprimento dos primers é um parâmetro fundamental porque influencia a sua especificidade e a sua temperatura de *annealing*. O comprimento ideal é de 18 a 30 pares de bases (pb). Os primers mais longos têm a vantagem de serem mais específicos, no entanto têm maior probabilidade de conter estruturas secundárias. Já os mais curtos têm a desvantagem de levar a amplificação inespecífica da PCR (17). Também deve-se evitar repetições de citocinas ou guaninas com mais de 3 pb de comprimento e colocá-los nas extremidades dos primers (16). A temperatura de *melting* ( $T_m$ ) é um parâmetro que determina a especificidade da PCR, sendo assim, é importante que os primers tenham a  $T_m$  semelhantes. A incompatibilidade da  $T_m$  dos pares de primers não deve ser superior a 2 °C-3°C (17). A  $T_m$  de um primer depende do seu comprimento, composição da sequência e concentração, mas para a maioria das aplicações de PCR a  $T_m$  ideal varia de 55°C a 60°C (16-18). A presença de estruturas secundárias é um dos pontos a considerar, porque uma sequência de primers com regiões de auto-homologia pode formar estruturas em gancho de cabelo (do inglês *hairpin structures*). Da mesma forma que a homologia pode levar à formação de dímeros de primer (17).

A DNA-polimerase termoestável (Taq polimerase), inicialmente purificado a partir de um microrganismo termófilo designado de *Thermus aquaticus* YTI, é um componente fundamental na reação de PCR, e é capaz de atuar em altas temperaturas (70°C a 80 °C). A polimerase de DNA isolada de *Thermus aquaticus* apresenta um peso molecular próximo a 93.910 kDa e tem uma taxa de incorporação de nucleotídeos de 150 nucleotídeos/s/ molécula enzimática (19). Atualmente, uma versão recombinante de polimerase de DNA Taq é feita a partir de fragmentos do gene *T. aquaticus* expresso em *E. coli* (16). Os desoxinucleósidos trifosfatos (dNTPs) é um outro elemento fundamental, considerados " os blocos de construção " que são adicionados à reação em quantidades iguais de cada um dos quatro dNTPs: dATP (adenina), dCTP (citocina), dGTP (guanina), e dTTP (timina) (16). Por fim, o íon Magnésio ( $Mg^{2+}$ ) é um catião que se liga à polimerase e é um cofator essencial para a atividade da polimerase (16). No entanto, o excesso de magnésio leva a um aumento na taxa de incorporação incorreta de nucleotídeos (17). O tampão que é adicionado é importante para fornecer um ambiente químico adequado. A sua composição química tem um pH de 9,0 a 25 °C que permite ter aproximadamente pH 7,6 a 72 °C, que é a temperatura ideal para a atividade e estabilidade da polimerase de DNA (16).

Como já referido, a reação de PCR tem por base mudanças de temperatura ao longo de 25-35 ciclos, normalmente. Cada ciclo é composto por três etapas principais: a desnaturação, a hibridização/*annealing* do primer ao DNA alvo, e a extensão enzimática/*elongation* (Fig.1). Vários autores (14,16) consideram

uma etapa adicional- a etapa de inicialização que precede as demais, e que consiste no aquecimento da reação a uma temperatura de 94–96 °C, que é mantido por 2 a 8 minutos, como observado na figura 1. Só é necessário para protocolos em que seja utilizada uma DNA polimerase que requer ativação por calor (do inglês *by hot-start PCR*) (16).

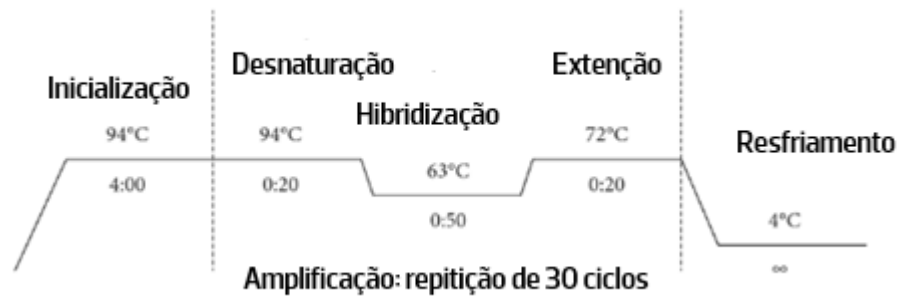


Figura 1 Diagrama ilustrativo das etapas de cada ciclo. Adaptado de (5)

A primeira etapa regular de todos os ciclos, consiste em aquecer a reação a 90–98 °C por 20 a 30 segundos (18), é a chamada etapa de desnaturaçãõ. Nesta etapa ocorre a separaçãõ da cadeia dupla de DNA interrompendo as ligações de hidrogênio entre as bases complementares, produzindo moléculas de DNA de cadeia simples. A temperatura de desnaturaçãõ é determinada em parte pela quantidade de nucleótidos G–C, que contém a cadeia dupla de DNA. A desnaturaçãõ por 45 segundos a 94–95°C é usada para amplificar moléculas de DNA lineares, cujo conteúdo em GC é < 55% e temperatura mais alta para DNAs com conteúdo de GC > 55% (16). Um período prolongado de desnaturaçãõ é desnecessário para moléculas lineares de DNA e, por vezes, pode ser prejudicial.

Na segunda etapa, denominada de hibridizaçãõ dos primers (*annealing*), ocorre a diminuiçãõ da temperatura para 55–70 °C entre 20–40 segundos, permitindo a ligaçãõ de primers ao DNA desnaturado (16). A temperatura de *annealing* depende dos primers. Teoricamente, estes devem estar alguns graus abaixo da temperatura de *melting* dos dois primers (que devem ser projetados para ter as mesmas temperaturas de *melting* ou próximas), para que eles possam formar complexos estáveis com as sequências alvo, mas não com outras sequências. Existem vários softwares gratuitos e comerciais que estão disponíveis para estimar as temperaturas de ligaçãõ do primer (15).

Na última etapa, conhecida como etapa de extensãõ, a DNA polimerase liga-se aos primers e dá-se a síntese de DNA, ao ler simultaneamente o DNA molde e colocando um nucleotídeo–dNTPs que complementa o molde (18) na direçãõ 5' para 3', condensando o grupo 5'-fosfato dos dNTPs com o 3'-grupo hidroxilo no final da cadeia de DNA nascente (16). Nesta etapa a temperatura aumenta para 72°C por 45 segundos. Esta temperatura é ideal para que a polimerase se torne funcional (16). O uso de temperatura de extensãõ elevada tem a vantagem de desnaturar qualquer estrutura secundária que se

pode formar no molde de DNA e bloquear a extensão (15). No final da extensão de cada ciclo, a síntese de duas novas cadeias ou *amplicons* (um curto segmento de DNA gerado pelo processo da PCR) é concluída e a quantidade da sequência alvo é dupla. A síntese de novas moléculas continua exponencialmente com o decorrer da reação (20).

Depois da reação de amplificação, a visualização e a análise do produto de amplificação pode ser feita pelo uso de eletroforese em gel de agarose (21). A partir deste método é possível separar os produtos da reação de amplificação (DNA/RNA) com base no tamanho e na carga. Isto permite determinar a presença e o tamanho do produto de PCR pela comparação com marcadores moleculares padronizados já conhecidos (21).

### 2.2.2. PCR em tempo real

A PCR em tempo real é uma tecnologia avançada capaz de monitorizar e detetar os produtos da reação de amplificação à medida que vão sendo sintetizados (22), por isso a designação em tempo real. Portanto, os dados de análise são recolhidos durante todo o processo de reação de PCR e não no final da reação. Para alcançar tal objetivo podem ser utilizados diferentes métodos de deteção.

Um dos métodos utiliza corantes fluorescentes inespecíficos, que tem como exemplo bem conhecido o *SYBR Green*, representado na figura 2, sendo bastante usado para deteção de carga viral e quantificação de citocinas (23). O modo de atuação desse corante fluorescente é pela ligação de modo não específico às cadeias duplas de qualquer DNA formado durante a reação (22), e quando irradiado com luz ultravioleta emite fluorescência (13). As medições fluorescentes são realizadas no final da etapa de extensão de cada ciclo de PCR para monitorizar a quantidade crescente de DNA amplificado. A utilização desta técnica é relativamente barata porque pode ser usada com qualquer par de primers para qualquer alvo (23).

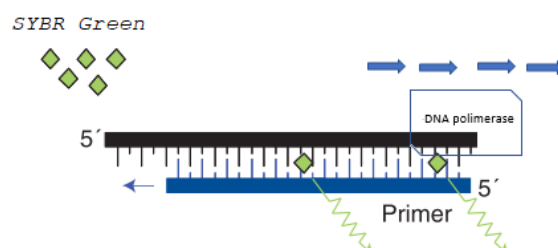


Figura 2 Corante fluorescente–*SYBR Green*, intercalam inespecificamente à dupla hélice de DNA formado durante a amplificação, emitindo fluorescência quando irradiadas. Adaptada do (23)

Um outro método utiliza sondas oligonucleotídicas, como por exemplo as sondas de hidrólise– *TaqMan* representada na figura 3 A. Esta sonda é marcada com duas moléculas que ficam próximas uma da outra, uma delas é a molécula fluoróforo/repórter (R) que emite fluorescência, e a outra é a molécula

supressora-quecher (Q), que absorve a fluorescência emitida pelo fluoróforo e, portanto, não se deteta sinal (13). Durante o processo da reação o primer e a sonda *TaqMan* ligam-se na cadeia de DNA complementar após a desnaturação, e à medida que DNA polimerase faz a extensão, a endonuclease 5' faz a hidrólise da sonda *TaqMan*, permitindo assim a emissão de fluorescência pelo fluoróforo (23). A fluorescência detetada no termociclador em tempo real é diretamente proporcional ao fluoróforo libertado e à quantidade de DNA presente na PCR (22). Também temos as sondas conhecidas por *Molecular Beacons*, representada na figura 3 B, também marcadas com um fluoróforo e um quecher (13). Esta sonda, quando livre, apresenta uma estrutura secundária em formato de gancho encontrando-se as duas moléculas próximas uma da outra. A fluorescência é detetada quando a sonda hibridiza com a sequência alvo, que altera sua conformação e separa as duas moléculas (23).

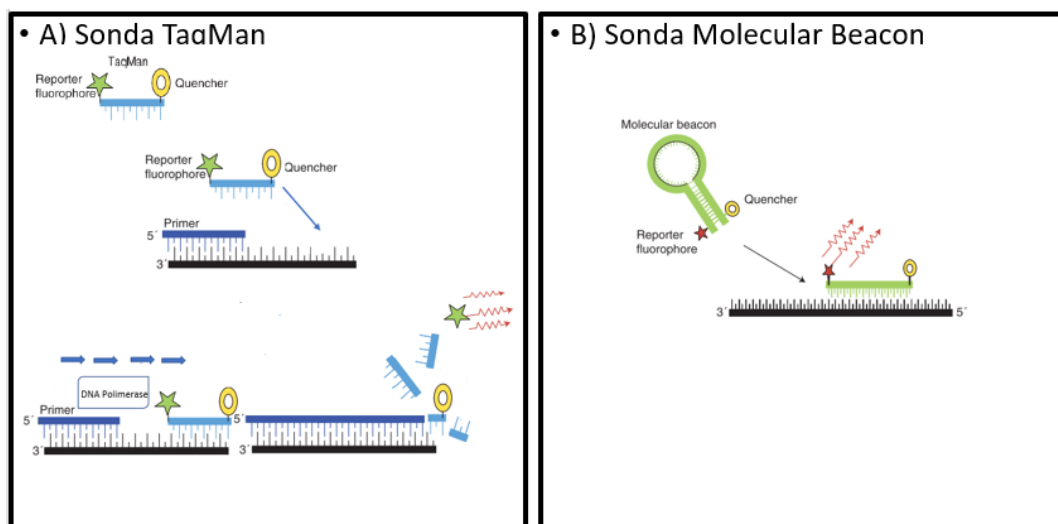


Figura 3 Sondas Oligonucleotídica. (A) Sonda TaqMan; (B) Sonda Molecular Beacon Adaptada (23)

Outra metodologia descrita na literatura utiliza sondas de hibridação, também conhecidas por Sondas FRET. Neste método são utilizadas duas sondas de hibridação, uma carrega um fluoróforo dador na extremidade 3' e a outra um fluoróforo aceitador/recetor na extremidade 5'. Ambas as sondas hibridizam com sua sequência de DNA alvo, logo após a sua desnaturação. Estas sondas são desenhadas para se ligarem em locais adjacentes para que haja uma aproximação das sondas (13). O dador transfere energia e excita o recetor permitindo que dissipe a fluorescência em um comprimento de onda diferente (22) (Fig.4). Este método tem uma especificidade aumentada, isto porque a fluorescência é detetada apenas quando duas sondas independentes hibridizam com sua sequência alvo correta. Sendo assim, pode-se afirmar que a fluorescência medida é diretamente proporcional à quantidade de DNA sintetizado durante a reação de PCR (23).

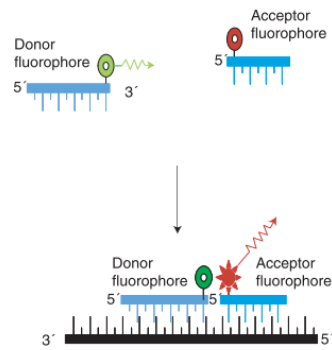


Figura 4 Sondas FRET-Fluorescence Resonance Energy Transfer. Adaptado de (23)

### 2.2.3. Variantes da PCR

A tecnologia de PCR é uma tecnologia complexa, suportada por instrumentos avançados e uma infinidade de protocolos laboratoriais que podem ser personalizados para diferentes áreas de aplicação (20). No diagnóstico molecular de doenças infecciosas são usados inúmeras variantes de PCR (13).

Uma das variantes da tecnologia de PCR caracterizadas na literatura é a PCR de transcriptase reversa (RT-PCR). Esta variante foi projetada para amplificar *in vitro* o DNA a partir do RNA (13). A transcriptase reversa transcreve o RNA em cDNA, que é então amplificado. Para tal uma enzima transcriptase reversa é usada para transcrever sequências de RNA transcritas em cDNA, e serve como modelo para que haja a reação de PCR (24). Esta técnica tornou-se uma alternativa de eleição para a detecção e/ou comparação dos níveis de RNA por apresentar alguns benefícios pois fornece informações sobre os dados qualitativos e quantitativos e não requer processamento pós-PCR, quando aplicada à PCR em tempo real (25). No diagnóstico clínico a RT-PCR é usada para fazer a avaliação da carga viral para vírus de RNA, para determinar a expressão de um gene ou para identificar a sequência de um transcrito de RNA, incluindo locais de início e término da transcrição (24).

A PCR Multiplex tem por princípio básico a utilização de múltiplos pares de oligonucleótidos iniciadores – primers, permitindo que mais de uma sequência de DNA alvo seja amplificada em uma única reação (20), e as várias sondas permitem saber o que está a ser amplificado.

Na realização deste tipo de reação o desenho dos primers deve ser otimizado para que todos os pares de primers possam utilizar a mesma temperatura de *annealing* durante a reação. Entretanto, a otimização das reações de PCR multiplex pode-se tornar desafiadora, porque a reação geral deve cumprir os parâmetros satisfatórios para cada reação individual de PCR incluída no multiplex (20).

Esta tecnologia tem sido amplamente utilizada para a detecção simultânea de um dado microrganismo e a presença de sequências genéticas relacionadas com a resistência a fármacos na sua terapia (ex.

*M.tuberculosis* multirresistente ou *S. aureus* à metilicina). Permite também identificar diferentes espécies dentro de um mesmo gênero (13).

Uma das vantagens da técnica é a maior rapidez na obtenção do resultado, maior economia a nível de reagentes, evitar a necessidade de configurar e processar reações individuais para cada sequência-alvo (20).

Uma outra variante é o NESTED PCR. Como se pode observar na figura 5, esta utiliza dois conjuntos de oligonucleótidos iniciadores-primers. Neste tipo de tecnologia o primeiro ciclo de amplificação, utiliza um dos pares de primers externo à região de DNA-alvo, obtendo-se assim um produto de amplificação. Este produto é utilizado como molde para uma segunda amplificação, em que se utiliza o outro par de primers mais interno, específico para a região a amplificar (13). Existem estudos descritos na literatura (13, 14) que apontam um aumento da especificidade, eficiência e sobretudo a sensibilidade da reação, o que é de grande importância na detecção direta de microrganismos em amostras clínicas.

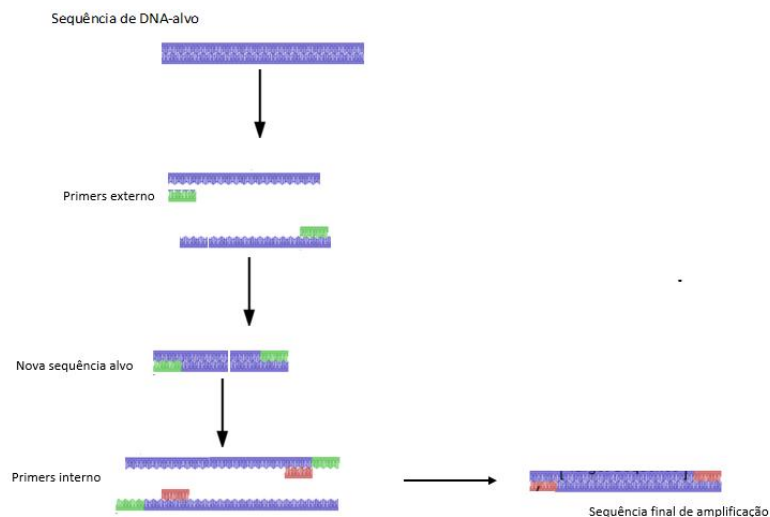


Figura 5 Esquema ilustrativo do NESTED PCR

### 2.2.3.1 Análise dos resultados da reação

O aumento da emissão de fluorescência durante a reação de PCR de qualquer um dos métodos utilizados é detetado por um termociclador (23), que possui um sistema ótico composto por uma fonte de iluminação ultravioleta e um detetor de fluorescência, acoplado a um software próprio. Com os dados de emissão de fluorescência colhidos durante a amplificação por PCR obtém-se o gráfico de amplificação (23).

A análise de dados de PCR em tempo real é estabelecida a partir da cinética do número de cópias alvo visualizada num gráfico que segue uma curva sigmoide e que demonstra a fluorescência emitida versus número de ciclo da reação.

Ao interpretar o gráfico é importante definir os termos que lhe estão associados a seguir descritos.

A Linha de base, *Baseline*, também conhecida como fase de atraso ou sinal de fundo, corresponde a um nível inicial de ciclos, onde o sinal fluorescente está a acumular-se, no entanto encontra-se abaixo dos limites de deteção do equipamento (23). O sinal da amplificação inicial do alvo permanece abaixo do ruído de fundo/*background*. O sinal fluorescente nesta fase é proveniente de uma sonda não ligada ou de componentes auto-fluorescentes na reação (15,28). Quando há amplificação suficiente, gera-se um sinal que começa a exceder a linha de base.

O *Threshold* é um limite arbitrário determinado pelo *software* com base na variabilidade da linha de base. Uma emissão detetada acima do limiar é considerada um sinal real que pode ser usado para definir o *Cycle Threshold* ( $C_t$ ), também denominado por *Ponto de Cruzamento* ( $C_p$ ) (29). O  $C_t$  é um componente essencial na produção de dados precisos e reproduzíveis. Quanto menos ciclos for preciso para detetar a fluorescência e determinar o  $C_t$ , maior é o número de moléculas iniciais que se introduziu na reação de amplificação de PCR (23). Ao observar o gráfico de fluorescência notam-se três fases distintas: a de crescimento exponencial, a de crescimento linear e a de *plateau*/ estacionária (15), como demonstrado na figura 6.

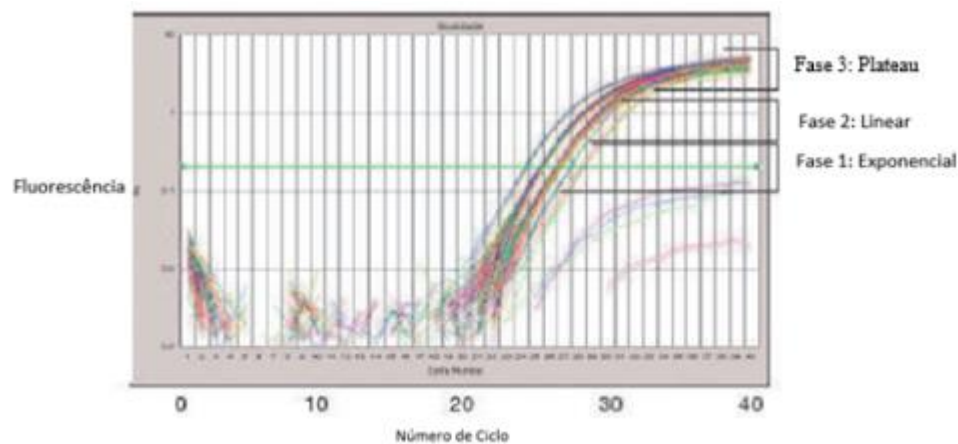


Figura 6 Gráfico de emissão de fluorescência, com a representação das fases da amplificação. Adaptada (74)

A fase exponencial tem início no momento em que a fluorescência da reação passa a ser detetável ( $C_t$ ) (15,23). Esta fase é caracterizada por uma alta e constante eficiência de amplificação e representa a fase de duplicação do produto a cada ciclo (30).

Depois da fase exponencial segue-se a fase linear, também conhecida como fase não-exponencial, onde a inclinação da curva de amplificação diminui de forma regular. Neste ponto, a eficiência da amplificação diminui, porque a concentração de um ou mais componentes da reação transpõe o limite crítico.

À medida que os componentes da reação se tornam limitantes a curva de amplificação atinge a fase plateau, onde se verifica pouco ou nenhum aumento no produto de PCR (23). Fatores como: *reannealing* dos produtos de PCR, limitação de enzima ou dNTPs e a formação de *amplicons* resultam na inibição da reação.

Para emitir um resultado, para além da interpretação do gráfico de fluorescência, é necessário verificar também a curva dos controlos da reação, pois a validação dos resultados está dependente desta interpretação.

Quando a deteção do ácido nucleico é feita com sondas inespecíficas (por exemplo, *YoPro* e *YoYo da Molecular Probes*), ou o uso de corantes tais como *SYBR Green 1* e *SYBR Gold*, a especificidade pode diminuir devido à amplificação de produtos de PCR inespecíficos e dímeros de primers. Portanto é necessário recorrer à análise da curva de *Melting*, como uma etapa para garantir a qualidade do resultado (23,31). A temperatura de *melting* ( $T_m$ ), temperatura na qual 50% do DNA é desnaturado, e os produtos de PCR podem ser estudados durante a amplificação por análise de curvas de *Melting* (32). Quando a  $T_m$  de um determinado produto de cadeia dupla (dsDNA), é atingida, haverá uma rápida diminuição na fluorescência num curto intervalo de temperatura, como demonstrado na figura 7A. Isso é detetado pelo equipamento e representado graficamente com um ou mais picos centralizados em diferentes temperaturas, que representam os pontos nos quais a taxa máxima de alteração da fluorescência é detetada, como exemplificada na figura 7B.

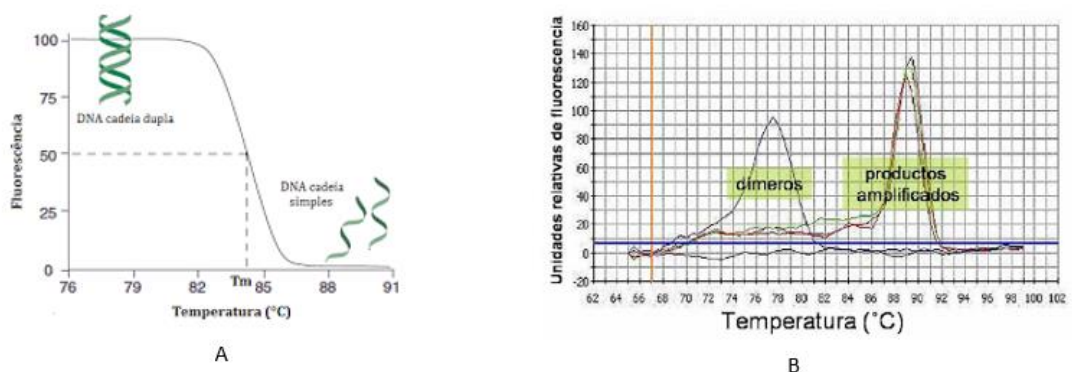


Figura 7 A) Gráfico ilustrativo da Temperatura de Melting B) Gráfico da Curva de Melting

*Amplicons* diferentes podem gerar picos diferentes centrados em temperaturas distintas. Os produtos de PCR indesejados normalmente têm temperaturas de fusão mais baixas do que o *amplicon* alvo, e isto permite confirmar a presença ou a ausência do ácido nucleico alvo.

Aquando da interpretação dos dados gerados após uma reação de PCR, dependendo da natureza dos dados, deve-se apresentar o resultado de modo qualitativo ou numérico, e quando necessário usar métodos gráficos para descrever as suas principais características. Sendo assim, pode-se distinguir dois tipos fundamentais de classificações: PCR qualitativos e PCR quantitativo.

A PCR qualitativa é usada para detetar a presença ou ausência de um produto de DNA específico. Esta técnica pode ser usada para fins de clonagem ou para identificar um agente patogénico (33). Em contrapartida, a PCR quantitativa representa informações resultantes de características suscetíveis de serem medidos, ou seja, indica quanto de um gene específico está presente na amostra (33).

A quantificação do resultado da PCR em tempo real pode ter duas vertentes, a quantificação absoluta/quantificação com curva padrão e quantificação relativa.

Em vários casos clínicos é importante saber o número exato de cópias do DNA/RNA alvo para correlacionar o número de cópias com um estado de uma doença, de forma a monitorizar a progressão da doença e tratamento. Para tal, recorre-se à quantificação absoluta, conhecida também como quantificação com curva padrão. É utilizada para quantificar amostras desconhecidas interpolando as quantidades de uma sequência alvo na amostra expressa como concentração ou número de cópias inicial, a partir de uma curva padrão (exemplificado no anexo 12) (23).

Na quantificação relativa a expressão de um gene alvo é medida em relação a um ou vários genes de referência. Os métodos utilizados para quantificação podem ser método de curva padrão ou método comparativo de  $C_t$ . Um ensaio de quantificação relativa pode ser utilizado para analisar alterações na expressão génica em resposta a um medicamento (34).

No laboratório de Biopatologia Molecular do Hospital de São João a metodologia de PCR em tempo real é utilizada para identificação de diferentes microrganismos. Os protocolos de PCR usados no serviço são cuidadosamente projetados para obtenção dos melhores resultados, já que a otimização da cinética da reação confere-lhe eficiência (20). No anexo 13, 14, 15 e 16 encontram-se descritos de forma resumida qual o tipo de PCR que é aplicado em cada tipo de microrganismo estudado neste laboratório, o método utilizado para deteção, e o kit usado ou se é técnica *in house*.

### **2.3. Controlo de qualidade interno e externo**

As técnicas de diagnóstico molecular aplicadas às doenças infecciosas assim como qualquer outro teste de diagnóstico, estão sujeitos a falsos resultados positivos e negativos. Cada etapa do protocolo deve ser monitorizada, desde a extração do ácido nucleico da amostra, à amplificação do alvo e posterior identificação do produto da reação (35). Deste modo, é de extrema importância a implementação de controlo de qualidade laboratorial, pois permite avaliar continuamente o desempenho do teste/metodologia, de forma a garantir a qualidade dos resultados obtidos, eliminar as possíveis causas de erro e implementar ações de prevenção de forma a evitar os mesmos.

Consideram-se resultados falsos-positivos, quando há um sinal que confirma a presença de um ácido nucleico, no entanto nenhum organismo está presente na amostra clínica (35). Os falsos-positivos ocorrem por contaminações que podem ser causadas durante o manuseamento da amostra, ou também

pode estar dependente da eficácia dos reagentes. As fontes de contaminação podem ser por contaminação cruzada causada por um grande número de organismos em amostras clínicas, ácidos nucleicos não amplificados que podem ser transferidos de uma reação anterior (35), ou então amplificação repetida da mesma sequência alvo, o que leva à acumulação de produtos de amplificação no ambiente de laboratório (36). Essas contaminações podem ser transportadas de uma amostra para outra, por exemplo por meio de uma luva ou ponta de pipeta contaminada (35) que quando amplificados, ocasionam os falsos-positivos.

Quando se fala de um resultado falso-negativo, refere-se a um agente infeccioso que está presente, mas não é detetado. Isto pode ser justificado por uma perda de DNA ou RNA devido à degradação por ação das RNases e DNases que estão presentes nas mãos, bancadas, pipetas e até mesmo nas amostras clínicas. Os falso-negativos também podem ser causados por inibidores de extração ou das reações de PCR, pela formulação inadequada de reagentes, diminuição da eficácia da extração ou amplificação, e por erros técnicos (35).

O controle de qualidade laboratorial é feito pela aplicação de Controle de Qualidade Interno (CQI) que de acordo com Despacho n.º 10009/2019 se define como um conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados dos exames laboratoriais ao longo de todo o processo analítico (37), e pela Avaliação externa da qualidade (AEQ), que corresponde à avaliação dos resultados por um organismo externo (37).

No laboratório de Biopatologia Molecular do CHUSJ são usados três indicadores de controlo no âmbito do controle de qualidade interno da reação de PCR: o controlo positivo, o controlo negativo e uma amostra pertencente ao programa, o controlo interno, que é adicionado na Master Mix. O controlo interno é uma sequência de DNA que amplifica nas mesmas condições que o DNA alvo. Quando há sinal positivo do segundo "alvo" demonstra que a amplificação foi bem-sucedida, o que permite perceber se as condições de amplificação são as ideais, e a detetar quando uma reação foi inibida (38).

É usual incluir um controle negativo ou "branco", que muitas vezes é adicionado água purificada em vez de uma amostra de DNA num dos tubos de reação (20). O controlo negativo é um indicador de uma possível contaminação dos reagentes que pode ser por uso indevido, o que ajudará a resolver quaisquer problemas relacionados à amplificação de falsos positivos (39). Para além da contaminação o controlo negativo garante que os reagentes são específicos para o DNA alvo (28) e ajuda a descartar a possibilidade da formação de dímeros de *primer*, que poderia ser amplificado.

O controlo positivo é uma amostra conhecida de DNA que replica as mesmas condições de reação do DNA alvo. Este serve para controlar os reagentes da reação, ou seja, o uso dos controlos positivos ajuda a excluir a possibilidade de falso-negativos da PCR que pode ser causado pela baixa qualidade de um ou mais componentes da reação ou por omissão errada de um dos constituintes da mistura de PCR (40).

A Avaliação externa da qualidade é feita pela comparação do desempenho do laboratório com outros laboratórios que utilizem os mesmos métodos. Análise comparativa destes dados permite reforçar a garantia dos resultados obtidos pelo laboratório em termos de exatidão e precisão (41).

O controlo de qualidade externo no CHU São João é assegurado pelo Controle de Qualidade para Diagnóstico Molecular (QCMD) (41) que é uma organização Internacional independente de Avaliação de Qualidade Externa (EQA), e pelo *International Quality Expertise UK* (NEQAS) (42). Para o efeito, o laboratório recebe uma série de amostras projetadas para se assemelhar a amostras clinicamente significativas e/ou avaliar as características específicas de ensaios analíticos. Nesta sequência, é realizado o teste com essas amostras usando o próprio teste de rotina e procedimentos padrão, além de responder a perguntas sobre a configuração, o método e os procedimentos do laboratório. Os resultados dos testes são enviados às instituições, e após o encerramento do período de testes dos participantes da EQA, os laboratórios participantes recebem um relatório individual, que fornece mais detalhes do desempenho geral de todos os participantes da EQA e do desempenho em relação a outros laboratórios que fazem parte do grupo de avaliação (41). O laboratório de Biopatologia Molecular do CHUSJ, participa na Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe (PNVG) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), que tem como objetivo assegurar a vigilância epidemiológica da gripe em Portugal. Atualmente o laboratório participa no novo programa de EQA para a deteção do vírus SARS-CoV-2 disponibilizado pelo Programa Nacional de Avaliação Externa da Qualidade (PNAEQ), cujo objetivo é avaliar o desempenho dos procedimentos para o diagnóstico laboratorial em laboratórios de forma a garantir a qualidade e fiabilidade dos seus resultados (43).

### **3. Estudo de caso: Identificação de pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* em amostras de sangue**

#### **3.1. Contextualização**

Nesta secção descreve-se as competências desenvolvidas ao longo deste estágio a nível de aplicação das técnicas de Biologia Molecular a um estudo de caso.

Durante o período de estágio foi solicitada a pesquisa de infeção por *Pneumocystis jirovecii*, num paciente do sexo masculino de 56 anos que apresentava fibrose pulmonar a partir de uma amostra de sangue. A pesquisa deste microrganismo é habitualmente realizada em amostras respiratórias, a partir de métodos de coloração convencionais, por testes de imunofluorescência direta ou indireta (principalmente anticorpos *anticystis*), e pela técnica de PCR em tempo real (44). A colheita das amostras respiratórias, nomeadamente do escarro induzido e líquido de lavagem broncoalveolar (45) requerem preparação cuidadosa e técnicos qualificados para processar (45) já que é um método invasivo.

Na sequência do pedido de pesquisa de *Pneumocystis jirovecii* em amostra de sangue foi decidido pela equipa de trabalho deste laboratório realizar o pré-tratamento da amostra de três formas distintas e posterior extração do DNA. Aquando da realização da amplificação do DNA, foi detetado DNA de *Pneumocystis jirovecii* a partir do plasma, que foi obtido por centrifugação. Na sequência deste resultado foi pesquisada a literatura de forma a se iniciar um protocolo que pudesse no futuro dar robustez à realização da pesquisa deste microrganismo em amostras de sangue.

Existem estudos descritos na literatura que indicam a invasão sanguínea durante a infeção aguda, e sendo o soro uma amostra biológica prontamente disponível, a possibilidade de tentar a deteção do DNA de *Pneumocystis jirovecii* por PCR em tempo real, pode ser considerado uma mais valia, principalmente para doentes que não podem ser submetidos a um procedimento invasivo devido a problemas clínicos, tais como tosse, insuficiência respiratória entre outros (45). Neste contexto, foi proposto realizar um estudo, com o objetivo de detetar o *Pneumocystis jirovecii* em amostras de soro (46,47) em indivíduos com diagnóstico de infeção por *Pneumocystis jirovecii*, obtido previamente a partir de amostras respiratórias.

##### **3.1.1. *Pneumocystis jirovecii***

*Pneumocystis spp.* é um organismo antigo que co-evoluiu com os mamíferos (48). O organismo *Pneumocystis spp.* encontrado em humanos, inicialmente denominado de *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* foi descrito pela primeira vez em 1909 por Carlos Chagas (49) que o identificou erroneamente como *Trypanosoma cruzi*. Todavia em 1912, no Instituto Pasteur em Paris, os investigadores Delanoë realizaram estudos em ratos livres de *Trypanosoma* e classificaram-no como sendo um protozoário (48).

Em 1988, a sequenciação do rRNA e análises subsequentes, comprovaram que o *Pneumocystis* pertence ao Reino Fungi e sub-reino Dikarya estando incluído no filo Ascomycota (48). Estudos mais detalhados das subespécies do organismo *Pneumocystis spp.* serviu de base para que houvesse a alteração do seu nome para *Pneumocystis jirovecii* por Frenkel em 1999 (50). Por pertencer ao Reino Fungi, é um organismo eucarionte unicelular oportunista, causador de Pneumocystis Pneumonia (PCP ou PcP-*Pneumocystis pneumonia* (50)) em humanos (51). A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* é das doenças infecciosas oportunistas mais comuns em infetados por vírus da imunodeficiência humana (52). Portadores imunocompetentes podem servir como reservatório e espalhar o fungo de um indivíduo para outro, por isso é considerado como antroponose (53). É transmitido principalmente pela inalação de partículas transportadas pelo ar a uma distância suficientemente próxima (49).

A transmissão de *Pneumocystis* a partir de pessoas assintomáticas é um fenómeno conhecido como colonização, fenómeno importante a se considerar, pois, para além da transmissão entre pessoas, indivíduos que já estão colonizados também correm o risco de desenvolver PcP em caso de diminuição da imunidade (54). A transmissão nosocomial, já é referida na literatura como uma forma de aquisição de infeção. Estudos realizados no departamento de nefrologia do Hospital Universitário de Reims (França) forneceram argumentos a favor do papel dos pacientes colonizados como fonte de proliferação no contexto de infeções associadas aos cuidados de saúde (53).

### 3.1.2. **Epidemiologia**

Os primeiros casos clínicos de PcP foram relatados durante a Segunda Guerra Mundial em orfanatos na Europa, eram comuns entre crianças desnutridas e mais tarde foram relatados em crianças em orfanatos iranianos. Com a epidemia da Síndrome da imunodeficiência adquirida- SIDA nos anos 80, mudou a incidência de PcP de uma doença rara para uma pneumonia mais comum e logo se tornou numa das principais doenças definidoras de infeção por HIV, desenvolvendo em 60% a 80% dos pacientes adultos em países com elevado índice de desenvolvimento. O primeiro declínio da incidência de PcP nos países industrializados, ocorreu em 1989 a percentagem de casos de SIDA com PcP caiu de 53% nesse ano para 42% em 1992. Entre os anos de 1992 a 1995 a taxa de PcP reduziu para 3,4%, devido ao uso da terapia antirretroviral combinada (55). A incidência de PcP em países de baixo e médio índice de desenvolvimento difere da incidência em países com elevado índice de desenvolvimento. A PcP é relatada como sendo pouco frequente na África (46,49), a maioria dos estudos iniciais aponta para taxas de prevalência de 0% a 11% em pacientes infetados pelo HIV. No entanto, a PcP pode não ter sido comumente declarado na África por vários motivos ligados essencialmente à limitação de recursos financeiros, humanos e materiais. Por exemplo, recursos limitados para o diagnóstico, a necessidade de pessoal de laboratório experiente para preparar amostras e interpretar resultados de diagnóstico, bem como o custo elevado de

equipamentos e pessoal especializados para obter amostras adequadas (38,39). A incidência de PcP em África pode estar a aumentar à medida que a epidemia de SIDA aumente (55).

Estudos indicam que a mortalidade associada à pneumonia por *Pneumocystis sp.* permanece elevada, e geralmente é mais elevada em pacientes sem SIDA, em comparação com pacientes com SIDA. Em pacientes com SIDA, a pneumonia por *Pneumocystis sp.* tem uma mortalidade de 10 a 30% e em pacientes não infetados por HIV a mortalidade é de 40 a 70% (54), por isso é importante ter especial atenção à esse grupo de doentes imunocomprometidos.

Apesar dos declínios de mortes e doenças por HIV no mundo desenvolvido a PcP continua a ser uma doença importante e improvável de ser erradicada. Segundo Francis Gigliotti e Terry W Wright o *Pneumocystis sp.* ainda é mantido na população humana (57), e em 2017, a pneumonia por *Pneumocystis sp.* estava entre as doenças indicativas de SIDA mais comuns diagnosticadas na UE / EEE com uma taxa de 21%, segundo o Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (58). Esta doença também ocorre em pacientes que ainda não foram diagnosticados com HIV ou não estão em tratamento médico, naqueles que não recebem tratamento para PcP, assim como, aqueles que não tomam ou não respondem à terapia antirretroviral. Consta-se que casos de infeções por HIV resistentes à medicação, podem contribuir no futuro para que haja um aumento da incidência de PcP (55).

Segundo os dados de vigilância epidemiológica da infeção por HIV em Portugal de 1983–2018 publicados no relatório conjunto da Direção Geral de Saúde– DGS e do INSA, a infeção por *Pneumocystis jirovecii* está classificado como a segunda patologia mais frequente referida no total de casos diagnosticados com um total de 20,9%, e nos três anos mais recentes, tornou-se a mais frequente em relação às doenças listadas como doenças definidoras de SIDA (59).

### 3.1.3. **Morfologia e Ciclo de Vida**

A maioria dos estudos relata a impossibilidade de obter crescimento do *Pneumocystis jirovecii* em cultura, o que dificulta a compreensão da sua morfologia e caracterização do ciclo de vida na sua totalidade. Esta situação foi ultrapassada através do estudo microscópico de organismos isolados diretamente do pulmão infetado (33,34), e a perceção de que o seu ciclo de vida é compatível com o ciclo de vida de outros fungos ascomicetes (49). Entretanto, um estudo de 2014 (60) descreve a primeira cultura e propagação bem-sucedida de *Pneumocystis jirovecii* a partir do líquido de lavagem broncoalveolar (LBA), usando um sistema de cultura de interface ar-líquido tridimensional formado pela linha celular epitelial respiratória CuFi-8. No entanto, o seu uso em laboratórios de diagnóstico de rotina é limitado pois requer cultura celular e ainda apresenta um custo elevado.

*Pneumocystis jirovecii* existe quase exclusivamente dentro dos pulmões dos hospedeiros infetados, apresenta muitas características, que o permitem denominar como um microrganismo biotrófico

obrigatório (48). Os estudos de microscopia eletrônica mostraram que durante o ciclo de vida de *Pneumocystis*, depara-se com três formas morfológicas de desenvolvimento: a forma trófica no estadio inicial, a forma pré-cisto na fase intermediária, e o cisto no estadio tardio, também conhecido como caso de esporos ou ascus (48,54).

A forma trófica de *Pneumocystis* predomina nos pulmões durante a infecção ativa e preenche o espaço alveolar, com apenas algumas formas císticas e pré-císticas presentes (48,61) e é mononuclear e de paredes finas. As formas tróficas variam de forma de acordo com o período do ciclo de vida/reprodutivo ou das condições ambientais, ou seja, são pleomórficas. Caracterizam-se por ser altamente irregular e variáveis em comprimento, podendo ir de 1 a 8 µm de comprimento. Apresenta várias estruturas pseudo-hifas que a podem ajudar a ancorar preferencialmente às células epiteliais alveolares tipo I nos alvéolos hospedeiros. Quando é analisada de forma ultra-estrutural apresenta um núcleo único cercado por uma fina membrana nuclear, retículo endoplasmático liso e rugoso, grânulos de glicogênio e, geralmente, uma única mitocôndria (48).

As formas tróficas são predominantemente haploides, embora também possam existir formas diplóides (61) em pequena quantidade (49). Na literatura é admitido que a forma trófica constitui o estadio proliferativo e a fase assexuada do ciclo (54). No entanto, há evidências crescentes de que *Pneumocystis* tem uma fase do ciclo de vida sexual.

A forma pré-cisto corresponde a um estadio intermédio de desenvolvimento, que pode ser um estadio intermediário na reprodução sexual. A forma pré-cisto tem uma forma mais esférica, com aproximadamente 4-8 µm. No seu formato inicial do pré-cisto ele é redondo e mononuclear, com composição de parede celular semelhante à forma trófica, exceto pelo fato de que as pseudo-hifas estão ausentes (48). Os cistos têm o papel principal na propagação de *Pneumocystis*, estes são gerados durante a fase sexual, como resultado da conjugação de trofozoítos (54).

No estadio tardio- estadio reprodutivo do desenvolvimento do ciclo de vida, aparece a forma cística, que é uma estrutura tipo ascus ou esporo, têm 4-8µm de comprimento. As formas tróficas jovens são libertadas a partir de cistos maduros, os quais se ligam às células epiteliais alveolares tipo I do mamífero hospedeiro (48). Como observado na figura 8, o ciclo de vida do *Pneumocystis jirovecii*, tem uma fase assexuada, na qual ocorre a reprodução de trofozoítos, e outra sexuada, que culmina com a formação do cisto maduro (62).

De maneira esquemática, a reprodução sexuada inicia-se com a ruptura de um cisto maduro, ocorrendo a libertação dos corpos intracísticos. Cada um destes corpos intracísticos evolui para um novo trofozoíto, dando assim, início a um novo ciclo de desenvolvimento. Na fase assexuada ocorre a reprodução de trofozoítos por divisão binária ou por endogenia (62).

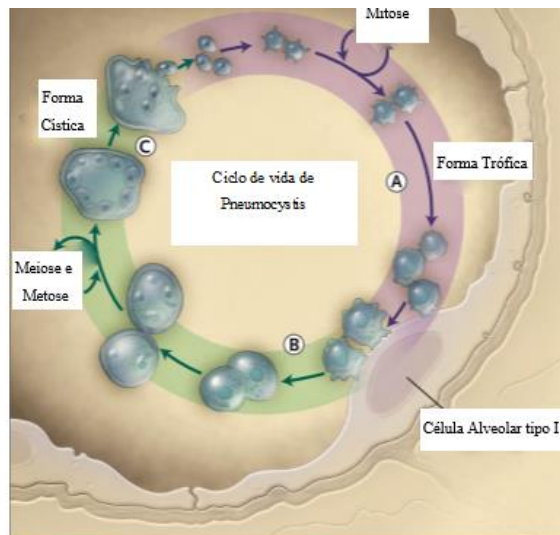


Figura 8: Ciclo de vida sexuado. Adaptada (61)

Após a infecção, a adesão estimula uma resposta imune no hospedeiro, causando lesões pulmonares. Quando a infecção ocorre num hospedeiro imunocompetente, é possível observar uma leve inflamação e pouco dano excessivo nos pulmões, por ação das citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e infiltrados celulares. Acredita-se que nestes hospedeiros, ocorre uma resposta equilibrada das células TCD4+ e CD8+. No entanto, quando a infecção ocorre em hospedeiros imunocomprometidos, a inflamação exuberante promove forte lesão pulmonar devido a resposta hiperinflamatória que danifica os pulmões e não elimina a infecção. Isto ocorre porque a resposta imunitária inicia pelas células TCD8+, devido à falta de células TCD4+ (52). Os neutrófilos e células TCD8+, induzem danos alveolares prejudicando também as trocas gasosas, levando à insuficiência respiratória (49).

A exposição no decorrer da infância pode resultar em casos ligeiros ou subclínicos. Contrariamente ao que se pensava a PcP resulta da aquisição de novo fungo, e não da reativação de formas latentes de *Pneumocystis jirovecii* presentes nos pulmões (53). A imunidade mediada por células inatas normalmente erradica esse agente patogénico. No entanto, com baixa contagem de linfócitos TCD4+ (<200 células/ $\mu$ L) não o podem erradicar apenas com imunidade inata (52).

### 3.1.4. Grupos de Risco

São considerados grupos de risco os doentes infetados pelo HIV e os não infetados por HIV que têm outras condições fisiológicas que os tornam suscetíveis. Como já referido, com a epidemia de HIV nos anos 80, 75% dos indivíduos com SIDA, foram infetados resultando em taxas de mortalidade de até 40%. Mais de 90% dos casos de PcP ocorreram em doentes com contagem de linfócitos TCD4 + <200 células/ $\text{mm}^3$  (63). A PcP afeta principalmente indivíduos que são diagnosticados tardiamente, que

desconhecem a sua infecção pelo HIV, ou então aqueles que não estão a receber cuidados contínuos contra a infecção (63).

Tem vindo a crescer o numero de casos em que a PcP tem sido diagnosticada em pacientes imunocomprometidos, não infetados pelo HIV, tais como: a) doentes pós-transplante, como por exemplo, pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoiéticas, pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos; b) doentes Hemato-oncológicos, que apresentam um risco substancial de desenvolver PcP, em especial pacientes com leucemia (como leucemia linfática aguda) e distúrbios linfoproliferativos (como leucemia linfática crônica e linfomas não-Hodgkin); c) recém-nascidos prematuros são também considerados de risco (52); d) doentes sob medicação imunossupressora por doenças autoimunes, pois as condições inflamatórias destas doenças e os regimes terapias com imunossupressores contribuem para o risco de PcP. Até 20% dos casos de PcP ocorrem em pacientes com doenças inflamatórias. Verifica-se maior incidência nos casos de poliarterite nodosa, granulomatose com poliangiite, dermatomiosite/polimiosite e doenças pulmonares intersticiais em doentes com artrite reumatóide, doença pulmonar crônica (50,63).

### 3.1.5. **Manifestações Clínicas**

O início da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* pode ter uma progressão rápida ou lenta. Estudos de coorte retrospectiva já realizados de casos de PcP em pacientes não infetados pelo HIV, evidenciam um início mais agudo dos sintomas ou até mesmo apresentam menos sintomas no diagnóstico, comparativamente com pacientes com SIDA. No entanto, nestes casos há uma progressão mais rápida da doença, e foram relatadas taxas de mortalidades mais elevadas, que podem ser atribuídas, em parte ao atraso no início de uma terapia anti-infeciosa específica (63). Os principais sintomas que podem estar presentes são febre, dispneia e tosse improdutivo. A hipóxia / insuficiência respiratória também é frequente, enquanto que dispneia e tosse são menos frequentes (63). A febre ou temperatura subfebril também é um sintoma a considerar. Para além destes sintomas, a candidíase oral e a perda substancial de peso também são frequentemente observadas. Um alto nível de LDH é um sinal desfavorável e pode indicar a gravidade de infecção. Por outro lado, a proteína C reativa geralmente é normal, desde que não haja outras infeções concomitantes (63).

Em pacientes infetados com HIV, perante a ausência de tratamento, o percurso da infecção termina quase sempre em morte (57). Nesses casos, depara-se com um início subagudo/ crônico dos sintomas, ao longo de vários dias e até semanas, o que permite a diferenciação de uma pneumonia bacteriana, apesar disso a deterioração pode ocorrer de forma rápida. E há risco de deterioração repentina após uma longa fase estável da doença.

### 3.1.6. Diagnóstico

As amostras clínicas comumente utilizadas no diagnóstico da *Pneumocystis jirovecii*, podem ser categorizadas em duas classes, as obtidas por técnicas invasivas (46) e as obtidas por técnicas não invasivas (64). As amostras obtidas por técnicas invasivas são as biópsias pulmonares e o lavado bronco-alveolar (LBA). As amostras obtidas por técnicas não invasivas são, expectoração induzida (EI), expectoração espontânea, secreções brônquicas (SB), aspirado nasofaríngeo ou lavado oral (LO) (45,46). As orientações para o diagnóstico de infecção por *Pneumocystis jirovecii*, geralmente recomendam a combinação de diferentes métodos. De entre os métodos de diagnósticos usados, as técnicas radiológicas do tórax são aplicadas durante as fases iniciais da doença (66), mostram particularmente doença alveolar bilateral, infiltrados intersticiais peri-hilares e bilaterais com mais frequência de lesões / cáries císticas (63). Tem a desvantagem de que em alguns casos, nenhuma anomalia radiográfica é detetável no início dos sintomas (57). No entanto a técnica de tomografia computadorizada (TC) é mais sensível, pois fornece evidências de infecção mesmo durante os estágios iniciais da doença em pacientes não infectados pelo HIV (66).

O diagnóstico padrão da PcP requer a visualização de cistos de *Pneumocystis jirovecii* no parênquima pulmonar (57), por exame microscópico de secreções respiratórias. Para isso são usados métodos convencionais de coloração ou de imunofluorescência indiretos, com anticorpos monoclonais direcionados aos cistos de *Pneumocystis jirovecii* (63), o que é mais rápido e inequívoco. Entretanto, a aplicação deste método de diagnóstico apresenta limitações, a primeira é que a análise microscópica está dependente das habilidades e da experiência do observador, para além disso a baixa carga fúngica pode impedir observação microscópica. E por fim, a análise é realizada em amostras colhidas durante a indução de escarro, o que pode não ser tolerado por alguns pacientes, ou então recorre-se a métodos mais invasivos para obtenção de amostras como lavado broncoalveolar (LBA) e biópsias pulmonares (54).

A aplicação de técnicas de diagnósticos mais recentes, tais como,  $\beta$ -D-Glucano e a PCR em tempo real, apresentam maior vantagem devido à rapidez de resultados e maior sensibilidade em relação às técnicas acima mencionadas. Além disso melhora o desempenho ao testar amostras menos invasivas, como amostras respiratórias superiores ou soro/sangue, aliviando a pressão clínica (66).

O ensaio sérico 1,3- $\beta$ -D-glucano é uma opção de diagnóstico altamente sensível (63). O 1,3- $\beta$ -D-glucano (BDG) é o constituinte comum da parede celular da maioria dos fungos patogênicos, incluindo *Pneumocystis jirovecii*, por esse fato tornou-se num biomarcador útil para algumas doenças fúngicas invasivas (IFDs) (65). No entanto, não deve ser usado como um único teste diagnóstico para PcP, pelo contrário em contexto clínico deve ser um teste complementar. Considerando que a BDG é um componente comum a várias espécies de fungos, como *Candida spp.*, *Fusarium spp.* e *Aspergillus spp.*, a

utilização deste método apresenta algumas controversas, porque o resultado pode ser dúbio em pacientes sintomáticos colonizados (65).

A PCR em tempo real é um método de diagnóstico adicional importante, particularmente em pacientes não infectados pelo HIV. Trata-se de um ensaio altamente sensível quando comparado aos métodos mais convencionais (67). Este método permite a detecção de cargas fúngicas muito baixas, que podem ser consideradas como colonização (63). De acordo com os autores Salzer HJF., Schäfe G et al, a sensibilidade da PCR é maior em relação à microscopia. O PCR quantitativo em tempo real no líquido do LBA, apresenta uma sensibilidade de 94 a 99%, e uma especificidade de 89 a 91% (63).

### **3.2. Metodologia**

Neste estudo descritivo transversal foi realizada a pesquisa do *Pneumocystis Jirovecii* em 4 amostras de doentes, 3 homens e 1 mulher, com idades entre 36 e 79 anos infectados pelo vírus HIV. Todos os pacientes já tinham sido submetidos à pesquisa de *Pneumocystis Jirovecii* pelas técnicas de Biologia Molecular em amostras de secreção brônquica/lavado brônquico, com resultando positivo. O processo de extração de DNA das amostras respiratórias foi realizada pelo protocolo de extração habitual do laboratório de Biopatologia Molecular do CHUSJ. E o protocolo de amplificação executado foi igual ao aplicado em amostras de sangue (plasma e soro).

Para a realização da pesquisa de *Pneumocystis jirovecii* nas amostras de sangue dos doentes quando não se encontrava disponível amostra no Laboratório de Biopatologia Molecular, recorreu-se a outros laboratórios do Hospital de São João que possuíam amostras armazenadas destes doentes.

#### **Extração**

O protocolo de extração do DNA a partir das amostras de soro e plasma, foi feita com o uso do kit EZ1 Virus Mini Kit v2.0 da Qiagen® (7) a partir de 400 µl da amostra, que usa a tecnologia de partículas magnéticas revestidas com sílica, passando pelas etapas de lise na presença da proteinase K e tampão de lise, que garantem a digestão das proteínas e inativação das RNases. Segue-se ao passo da ligação dos ácidos nucleicos às partículas magnéticas para permitir uma ótima adsorção de ácidos nucleicos na superfície da sílica. As condições de sais e pH garantem que proteínas e outros contaminantes, não estejam ligados às partículas magnéticas. De seguida passa-se à etapa das lavagens com tampões de lavagem, e por fim a eluição com o tampão AVE ficando com o produto final 60 µl, ilustrado na figura 9.

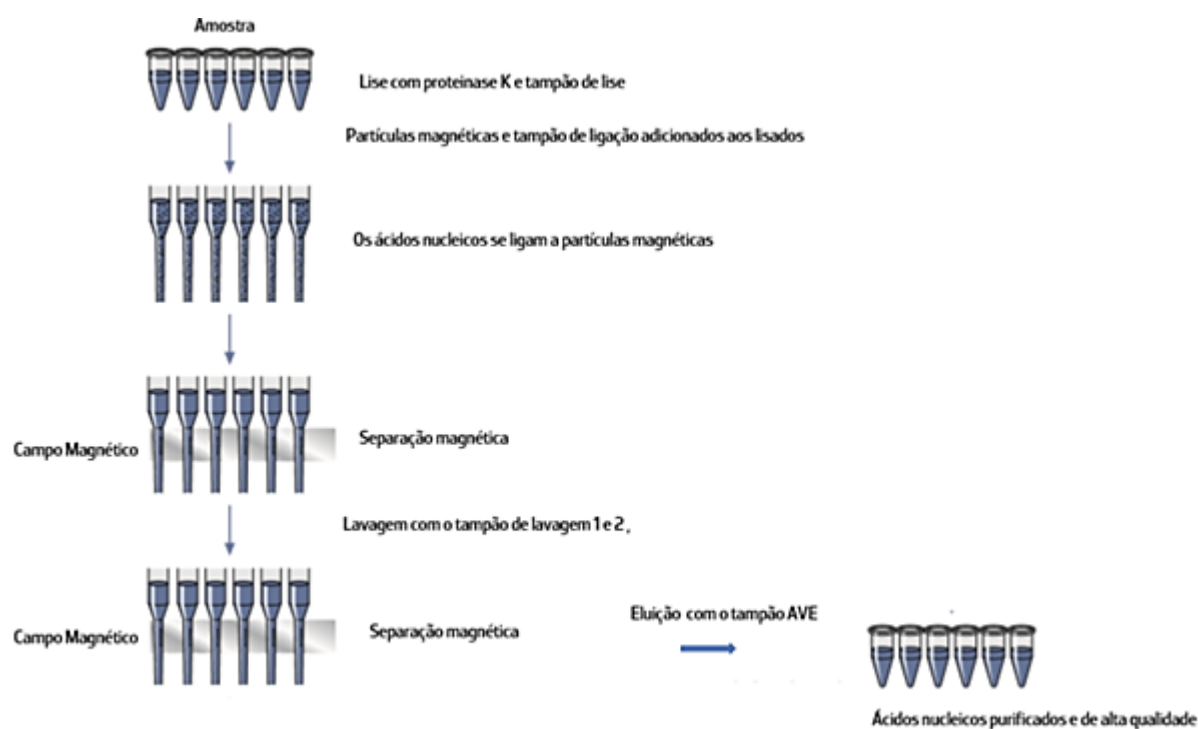


Figura 9 – Procedimento de Extração de Ácidos Nucleicos. Adaptada de (7)

## Amplificação

O protocolo de amplificação do DNA por PCR em tempo real que é uma técnica *in house*, começou pela preparação da Master Mix. A composição numérica da Master Mix é 35 µl do MM Sybergreen, e 2,5 µl do Primer Reverse-5S-antisense que tem como sequência nucleotídica: 5´-AAA GCT ACA GCA CGT CGT AT-3´ e 2,5 µl e do primer Foward- 5S-sense que tem como sequência nucleotídica: 5´-AGT TAC GGC CAT ACC TCA GA-3´. A distribuição da mastermix para cada microtubo foi de 40 µl e 10 µl da amostra extraída. O DNA alvo que se pretende detetar é o gene 5S rDNA. As condições da reação de PCR estabelecidas foram num total de 50 ciclos, com o seguinte esquema de tempo/temperaturas: 1º desnaturação 15 segundos, 95°C; 2º annealing 30 segundos, 55°C; 3º extensão 30 segundos; 72°C (com aquisição em FAM) e 4º 10 segundos; 84°C, consecutivamente até 50 ciclos. A deteção do DNA é feita pelo uso de corantes fluorescentes inespecíficos, SYBR Green, e a curva de melting é formada na seguinte temperatura/tempos: 60°C ;30 e 60 segundos.

Tabela 1 Preparação da reação de amplificação

Reagentes	Volume
MM sybergreen	35 µl
Primer PCR	2,5 µl
Primer PCF	2,5 µl
Volume Final mix	40 µl
DNA	10 µl
Volume final da reação	50 µl

### 3.3. Resultados e Discussão

A análise dos resultados da deteção de *Pneumocystis jirovecii*, no laboratório de Biopatologia Molecular do CHUSJ, é de carácter qualitativo, ou seja, as amostras são classificadas com um resultado positivo ou negativo.

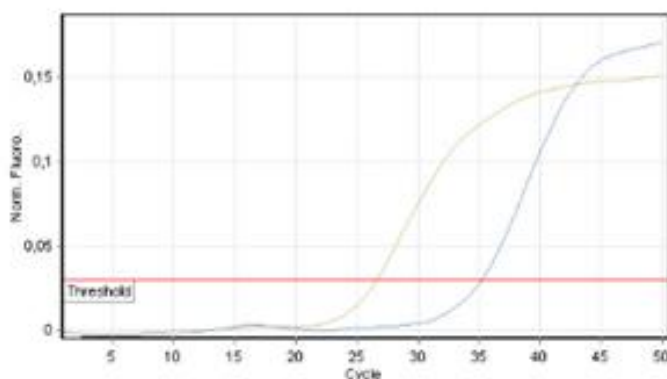
Após a reação de PCR, constatou-se que todas as amostras de soro analisadas apresentaram um resultado positivo. A tabela 2 apresenta de forma resumida os resultados obtidos. As figuras 7 e 8, apresentam para cada amostra as curvas de amplificação do DNA e a curva de *melting*. As amostras foram amplificadas com picos de desnaturação que variam de 60 a 65°C, e com o  $C_t$  de 36,67 para os controlos positivos e os  $C_t$  das amostras com variação entre 33,2 e 38,53.

Tabela 2 Síntese dos resultados obtidos

Utentes	Amostras Respiratória	Plasma	Soro
Utente 1	POSITIVO	sem amostra	POSITIVO
Utente 3	POSITIVO	sem amostra	POSITIVO
Utente: 4	POSITIVO	sem amostra	POSITIVO
Utente 2	POSITIVO	NEGATIVO	sem amostra

Cor	Nome	$C_t$
■	Cp ppc	26,67
■	Utente 3	35,26

Quantitation data for Cycling A.FAM



Melt data for Melt A.FAM

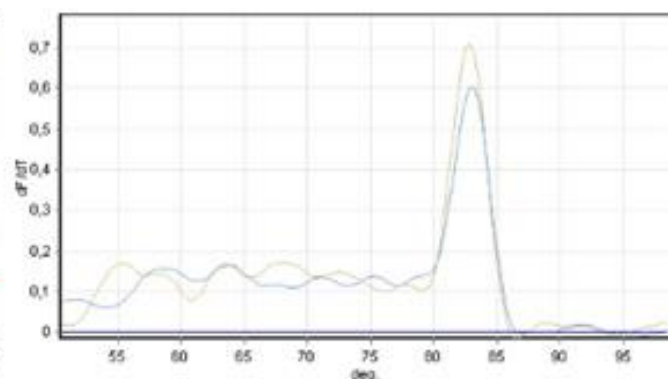


Figura 10 Curva de amplificação e Curva de Melting do Utente nº3

Cor	Nome	$C_t$
■	Cp ppc	26,67
■	Utente 1	33,28
■	Utente 2	38,65
■	Utente 4	38,35

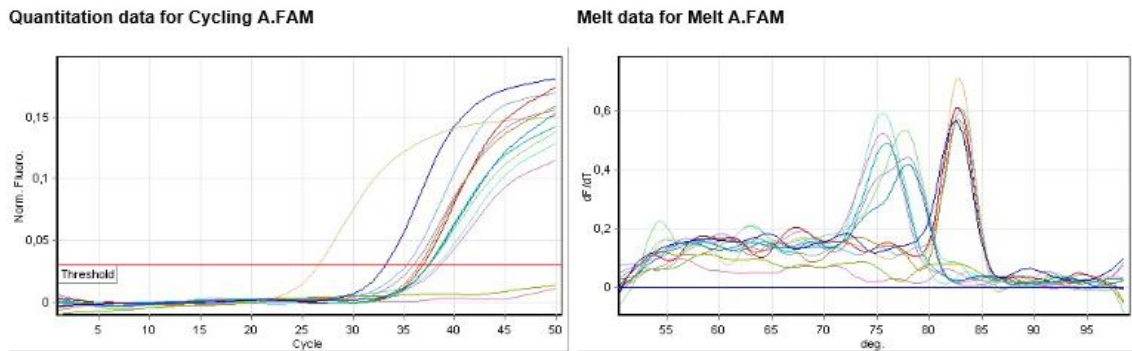


Figura 11 Curva de amplificação e Curva de Melting

Como referido anteriormente, o diagnóstico clássico da *Pneumocystis jirovecii* é essencialmente por métodos de coloração e posterior visualização microscópica do líquido do LBA, escarro ou lavagem orofaríngea (68). No entanto, tem como desvantagem baixa sensibilidade, devido a vários fatores, como por exemplo a falta de experiência do observador (47), sendo por isso ideal o desenvolvimento de protocolos mais sensíveis e mais específicos. Os testes moleculares podem ultrapassar estas limitações. Protocolos de PCR em tempo real quantitativos em amostras respiratórias permitem uma maior sensibilidade que a visualização microscópica (69–71). Contudo, conforme já referido, as amostras respiratórias convencionais, tais como lavagem broncoalveolar e expectoração induzida podem ser difíceis de obter. Para além disso, a broncoscopia é um procedimento invasivo, o qual pode conduzir a um risco acrescido para o doente (47). Assim, é de mais valia poder implementar um protocolo que permita identificar o *Pneumocystis jirovecii* utilizando uma amostra de mais fácil obtenção e menos invasiva. Desde o início da década de 90 que têm surgido vários estudos para a deteção deste microrganismo a partir de amostras de soro, em que relatam que a frequência de deteção do DNA do *Pneumocystis sp.* por PCR no sangue mostrou grande variabilidade (72). No entanto, esta variabilidade pode ser explicada por várias hipóteses, tais como um baixo número de cópias do DNA molde presente no sangue, uma suscetibilidade (ou labilidade) peculiar de sequências específicas a DNase séricas do hospedeiro ou outros fatores intrínsecos relacionados ao microrganismo, como diferenças na invasão (45). Para além disso as diferenças nos protocolos de extração não automatizados de DNA e ensaios de PCR convencional utilizados nos diferentes estudos, podem explicar também essas variações (46). Na revisão da literatura

de Wang Dong et al, de artigos relacionados à detecção de DNA no soro, demonstraram que estudos realizados entre os anos de 1991 e 2012 apresentam sensibilidade que varia de 0% a 100%, enquanto que a especificidade variou de 86,4% a 100% (47), como resumido na tabela 3.

Tabela 3 Sensibilidade e Especificidade da pesquisa do DNA no soro no diagnóstico de PcP. Tabela adaptada de (47)

Ano	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
1991	38,9	-
1992	85,7	100
1995	100- Com a sequência alvo- ITSs 10- Com a sequência alvo-DHFR	100
1996	0	-
1996	100	-
1997	7,7	86,4
1998	71,4	100
2012	90,0	100

Legenda: DHFR: di-hidrofolato redutase do inglês dihydrofolate reductase, ITSs: espaçadores internos transcritos

No entanto, vários estudos relataram ser possível a detecção de *Pneumocystis jirovecii* em amostras de soro por PCR em tempo real face a outros tipos de diagnósticos, comparando-os quanto à sensibilidade e especificidade. Num estudo cujo objetivo foi avaliar o potencial diagnóstico de PCR em tempo real de *Pneumocystis jirovecii* no soro combinado com o teste 1,3-  $\beta$ -D-glucano como alternativa do diagnóstico de PcP em pacientes infetados pelo HIV, comprovou-se a detecção do DNA de *Pneumocystis jirovecii* no soro, produzindo assim uma sensibilidade de detecção de 100% (46). Este estudo apoia a hipótese de que um resultado positivo de PCR em soro poder ser usado para confirmar a infecção. Este resultado, vai de encontro com os resultados encontrados (tabela 2) no presente estudo de caso. Outro estudo de 2017 (47), que tinha como objetivo revelar o valor diagnóstico do DNA no soro através do método de PCR em tempo real quando comparado com a coloração de metenamina de prata de Grocott-Gomori (GMS), obtiveram como resultado uma sensibilidade da PCR de 77,8% na pesquisa do DNA em amostras de soro, sensibilidade esta semelhante para amostras de LBA e a PCR do escarro. No entanto, neste mesmo estudo comprovaram que a especificidade da PCR no soro foi de 79,3%, resultado superior ao obtido na PCR de líquido com LBA e da PCR de escarro. Assim, verificou-se que a detecção por PCR no soro é sensível e específica, pelo que parece ser um excelente método para a detecção do *Pneumocystis sp.*

Embora o número de doentes na nossa amostra seja muito reduzido, os nossos resultados apontam no sentido dos estudos de PCR em tempo real acima referidos. Neste caso, em todas as amostras de soro testadas obtivemos um resultado positivo para *Pneumocystis jirovecii*.

No caso do utente nº 2, não foi possível a obtenção de amostra de soro, apenas se conseguiu uma amostra de plasma, contudo, a PCR a partir desta amostra deu um resultado negativo. Hammarström *et al*, 2019 (46), refere num estudo piloto que testaram diferentes frações do sangue para pesquisa de *Pneumocystis jirovecii* ter verificado uma elevada taxa de inibição da PCR quando utilizavam amostras de plasma, o que não acontecia com as amostras de soro, podendo esta razão justificar o resultado obtido para o doente nº 2.

Outra variável a ter em consideração nestes ensaios é o gene a ser amplificado. Existem na literatura um conjunto de genes alvo para pesquisa do *Pneumocystis*, que são: o gene 18S rRNA, rRNA mitocondrial (mt rRNA), 5S rRNA, a timididase sintase (TS), diidrofolato redutase (DHFR) e ITS (internal transcribed spacers) (73). Lu, Jang-jih *et al*, desenvolveram um método designado Pc-ITS-PCR, onde utilizaram o Nested PCR para amplificar espaçadores internos transcritos (ITS) dos genes de rRNA, e concluíram que este gene (Pc-ITS) é o mais sensível e específico em comparação com outros genes alvo (73). Face a isso, pode-se concluir que a implementação deste gene alvo num possível protocolo aumentaria a probabilidade de deteção de *Pneumocystis sp.*

Na literatura existem estudos em que utilizam PCR em tempo real quantitativa que permitem, para além de verificar a presença do *Pneumocystis jirovecii*, quantificar o número de cópias presente na amostra, bem como a eficiência da reação. Neste estudo de caso, apenas obtivemos como resultado positivo ou negativo, impossibilitando esta análise quantitativa.

Todavia, os condicionantes acima apontados não tiram a relevância do presente estudo de caso e encoraja estudos futuros mais aprofundados no sentido de validar um método de deteção menos invasivo. Este investimento inicial sem dúvida será compensado pelas vantagens de podermos realizar protocolo com amostras de soro que são muito mais fáceis e menos dispendiosas de recolher do que as amostras de LBA e, por outro lado, possibilitará o diagnóstico de PcP em doentes para os quais os procedimentos de broncoscopia invasiva são difíceis, e até não recomendados em casos complicados (73).

#### 4. Conclusão

Este relatório de estágio teve por função a descrição das atividades realizadas ao longo do período de estágio curricular, cumprindo-se assim o objetivo de consolidar tanto na vertente teórica como na vertente prática os conhecimentos e competências a nível da extração de ácidos nucleicos e da reação em cadeia da polimerase aplicadas ao diagnóstico microbiológico clínico. Com efeito, o presente relatório descreve as atividades realizadas durante o referido período, destacando o estudo de caso, com o enfoque na deteção de *Pneumocystis jirovecii*. Tendo sido já evidenciado a deteção de *Pneumocystis jirovecii* em amostras de soro, a proposta estabelecida foi tentar clarificar esta evidência. O resultado obtido neste estudo de caso, demonstrou como positivo para todas as amostras de soro analisadas, o que aponta à viabilidade e deteção deste microrganismo no soro.

Com este resultado constata-se que devido à alta sensibilidade e especificidade de detetar o *Pneumocystis* no soro é de mais valia estabelecer o diagnóstico de PcP através desta metodologia, pela rapidez e precisão do diagnóstico, e por ser uma forma menos invasiva para doentes que não toleram técnicas mais invasivas. Embora seja um estudo exploratório para o laboratório de Biopatologia Molecular, tem valor capital já que é um método mais rápido, mais simples e mais económico.

Como perspetiva futura, seria uma mais valia a validação desta metodologia, pela implementação de um estudo com uma amostra estatisticamente significativa que inclua amostras LBA e soro de pacientes que apresentam dois dos três sinais clínicos de PcP. Este desenho de estudo permitirá assim comparar os resultados obtidos a partir de amostra respiratória e soro, quanto à especificidade e à sensibilidade, sempre acompanhado dos resultados obtidos pelo padrão, avaliação microscópica de LBA.

Poderia ainda ter interesse desenvolver um protocolo de PCR quantitativo bem como desenhar primers para genes alvo que, noutros estudos, apresentaram melhores resultados para a pesquisa do *Pneumocystis jirovecii*.

## Referências Bibliográficas

1. Pelt-Verkuil E van, Belkum A van, Hays JP. Ensuring PCR Quality – Laboratory Organization , PCR Optimization and Controls The Primary Level of Quality Control – Laboratory. In: Springer D, editor. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification [Internet]. Springer, Dordrecht; 2008. p. 183–212. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-6241-4\\_10#citeas](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4020-6241-4_10#citeas)
2. Barroso H, Silvestre AM TN. Microbiologia Médica, Fundamentos de Microbiologia. Lidel, editor. Lisboa; 2014. Vol. 1.
3. Oliveira M, Regitano L, Roese A, Anthonisen D, Patrocínio E, Parma M, et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de dna por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase [Internet]. São Carlos: Embrapa; 2007. Available from: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/48295/1/LivroProtMolecular.pdf>
4. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. Appl Microbiol Biotechnol. 2006;73(3):495–504.
5. Al HIHMHG et. Tools and Techniques in Biomolecular Science [Internet]. Aysha Divan JR, editor. 2013. 14–15 p. Available from: [https://books.google.pt/books?id=ONwDmnKTnQ4C&pg=PR10&dq=Divan,+A.,+Royds,+J.+\(2013\)+Tools+and+techniques+in+biomolecular+science.+Oxford&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjJ\\_9nu5Z7oAhUJZcAKHVmLBF8Q6AEIPzAC#v=onepage&q&f=false](https://books.google.pt/books?id=ONwDmnKTnQ4C&pg=PR10&dq=Divan,+A.,+Royds,+J.+(2013)+Tools+and+techniques+in+biomolecular+science.+Oxford&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwjJ_9nu5Z7oAhUJZcAKHVmLBF8Q6AEIPzAC#v=onepage&q&f=false)
6. Silva CJ, Vázquez-fernández E, Onisko B, Requena JR. Proteinase K and the structure of PrP Sc : The good , the bad and the ugly. Sci Elsevier- Virus Res [Internet]. 2015;207:120–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168170215001264>
7. QIAGEN. October 2010 EZ1 ® Virus Handbook. In: EZ1® Virus Handbook 3rd ed [Internet]. Germantown; 2010 [cited 2020 May 26]. Available from: <https://www.qiagen.com/ca/resources/resourcedetail?id=ca13c92a-4b1b-4ced-9796-b0414a166803&lang=en>
8. Boom R, Salimans M, Sol C J, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der NJ. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids. J Clin Microbiol [Internet] [Internet]. 1990;28(3):495–503. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1691208>
9. Boris Böddinghaus,\* Thomas A. Wichelhaus, Volker Brade and TB. Removal of PCR Inhibitors by Silica Membranes : Evaluating the Amplicor Mycobacterium tuberculosis Kit. J Clin Microbiol [Internet]. 2001;39(10):3750–2. Available from: <https://jcm.asm.org/content/39/10/3750.abstract>
10. Zhou Z, Kadam U, Irudayaraj J. One-stop Genomic DNA Extraction by Salicylic Acid Coated

- Magnetic Nanoparticles. *Anal Biochem* [Internet]. 442(2):249–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.030>
11. Gong Rui SL. Extraction of human genomic DNA from whole blood using a magnetic microsphere method. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:3781–9.
  12. Quiagen. QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. 5th ed. In: 5th ed. Germantown: Quiagen; 2016.
  13. Viveiros Miguel, Couto Isabel IJ. Microbiologia Médica 1: Fundamentos de Microbiologia Conceitos Básicos da resposta Imunológica Princípios do Diagnóstico Microbiológico Médico Bacteriologia. In: LIDEL, editor. p. 182–93.
  14. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic Amplification of  $\alpha$ -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Sci* [Internet] [Internet]. 230((4732)):1350–4. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/230/4732/1350/tab-pdf>
  15. Andrade M, Kubista M, Lind K, Sindelka R, Sjo R, Stro L, et al. The real-time polymerase chain reaction in Sjo. *Mol Asp Med* [Internet]. 2006;27(2–3):95–125. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460794>
  16. Verma K, Dalal J SS. Scientific concepts of polymerase chain reaction (PCR). *Int J Pharm Sci Res* [Internet]. 2014;5(8):3086–95. Available from: <http://ijpsr.com//?s=SCIENTIFIC+CONCEPTS+OF+POLYMERASE+CHAIN+REACTION+%28PCR%29&x=9&y=9>
  17. Apte A, Daniel S. PCR Primer Design. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 2009;4(3):1–10. Available from: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/3/pdb.ip65.short>
  18. Waters DLE, Shapter FM. Chapter 7 The Polymerase Chain Reaction ( PCR ): General Methods. In: *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* [Internet]. Nova york; 2014. p. 65–75. Available from: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-715-0\\_7](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-62703-715-0_7)
  19. Atlas Ronald M, Bej K. Asim MHM. Amplification of Nucleic Acids by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Other Methods and their Applications. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 1991;26(3–4):301–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10409239109114071>
  20. Royds J. DA. Working With DNA and RNA. In: Royds, Aysha DJ, editor. *Tools and Techniques in Biomolecular Science*. 1st ed. Oxford: Oxford University Press 2013; 2013. p. 23–42.
  21. Daniel V. Agarose Gel Electrophoresis. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001;51(1):2.5A.1–2.5A.9.
  22. Monteiro F, Tavares G, Ferreira M, Amorim A, Bastos P, Rocha C, et al. Technologies involved in molecular blood group genotyping. *Int Soc Blood Transfus Sci Ser* [Internet]. 2011;6:1–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-2824.2011.01425.x>

23. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn* [Internet]. 2005;5(2):209–19. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14737159.5.2.209?scroll=top&needAccess=true>
24. Bachman J. Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). 1st ed. Lorsch J E, editor. Vol. 530, *Laboratory Methods in Enzymology: RNA*. Academic Press; 2013. 67–74 p.
25. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2004;34(3):597–601. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956331>
26. Figueirêdo J, Maria L, Montenegro L, Montenegro RDA, Maciel M, Cabral L, et al. Performance of nested PCR in the specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in blood samples of pediatric patients. *J Bras Pneumol* [Internet]. 2009;35(7):690–7. Available from: <https://www.scielo.br/pdf/jbpneu/v35n7/v35n7a11.pdf>
27. Shatleh-rantisi D, Tamimi A, Ashhab Y. Improving sensitivity of single tube nested PCR to detect fastidious microorganisms. *Heliyon* [Internet]. 2020;6(November 2019):e03246. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03246>
28. Tubbs Raymond, Stoler Mark WWG. Section II. Molecular Tools and Techniques [Internet]. 1<sup>o</sup>. Livingstone C, editor. *Cell and Tissue Based Molecular Pathology Foundations In Diagnostic Pathology*. Philadelphia; 2009. 17–42 p. Available from: <https://books.google.pt/books?id=78ZeuOjmeYcC&pg=PA40&dq=what+is+positive+and+negative+control+of+the+PCR+reaction&hl=pt-PT&sa=X&ved=0ahUKEwiQzKmq9ZnpAhUN8BQKHcTMA4cQ6AEliwEwCQ#v=onepage&q&f=true>
29. Rebrikov D V, Trofimov DY. Real-Time PCR: A Review of Approaches to Data Analysis. *Prikl Biokhimiya i Mikrobiol* [Internet]. 2006;42(5):520–8. Available from: [https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr.html?gclid=Cj0KCQjwgJv4BRCrARIsAB17JI5uK6YZFP-29HbCY6ykr7vC7jtA1gbVSz0e-yWdaYZLDzoiMVnykY8aAhXIEALw\\_wcB&cid=gsd\\_pcr\\_sbu\\_r01\\_us\\_cp1247\\_pjt4056\\_gsd00000\\_0se\\_gaw\\_nt\\_pur\\_10033082&s\\_kwid=AL!3652!3!285135460702!p!!g!!real time pcr&ef\\_id=Cj0KCQjwgJv4BRCrARIsAB17JI5uK6YZFP-29HbCY6ykr7vC7jtA1gbVSz0e-yWdaYZLDzoiMVnykY8aAhXIEALw\\_wcB:G:s&s\\_kwid=AL!3652!3!285135460702!p!!g!!real time pcr](https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr.html?gclid=Cj0KCQjwgJv4BRCrARIsAB17JI5uK6YZFP-29HbCY6ykr7vC7jtA1gbVSz0e-yWdaYZLDzoiMVnykY8aAhXIEALw_wcB&cid=gsd_pcr_sbu_r01_us_cp1247_pjt4056_gsd00000_0se_gaw_nt_pur_10033082&s_kwid=AL!3652!3!285135460702!p!!g!!real time pcr&ef_id=Cj0KCQjwgJv4BRCrARIsAB17JI5uK6YZFP-29HbCY6ykr7vC7jtA1gbVSz0e-yWdaYZLDzoiMVnykY8aAhXIEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!285135460702!p!!g!!real time pcr)
30. Assays ARPCR. *Essentials of Real Time PCR About Sequence Detection Chemistries TaqMan Chemistry*. :1–8.
31. Fraga D, Meulia T, Fenster S. Real-Time PCR. *Curr Protoc Essential Laboratory Techniques*

- [Internet]. 2008;0(1):10.3.1-10.3.34. Available from: <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s00>
32. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem* [Internet]. 1997;245(2):154–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9056205/>
  33. Garibyan Lilit AN. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol* [Internet]. 2014;133(3):1–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4102308/>
  34. Thermo Fisher Scientific sem data. Absolute vs. Relative Quantification for qPCR [Internet]. [cited 2020 Jul 16]. Available from: <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/absolute-vs-relative-quantification-real-time-pcr.html>
  35. Sefers S, Pei Z, Tang Y. False positives and false negatives encountered in diagnostic molecular microbiology. *Rev Med Microbiol* [Internet]. 2005;16(2):59–67. Available from: [https://journals.lww.com/revmedmicrobiol/Abstract/2005/04000/False\\_positives\\_and\\_false\\_negatives\\_encountered\\_in.4.aspx](https://journals.lww.com/revmedmicrobiol/Abstract/2005/04000/False_positives_and_false_negatives_encountered_in.4.aspx)
  36. Aslanzadeh J. Brief Review: Preventing PCR Amplification Carryover Contamination in a Clinical Laboratory. *Ann Clin Lab Sci* [Internet]. 2004;34(4):389–96. Available from: <http://www.annclinlabsci.org/content/34/4/389.long#cited-by>
  37. Despacho G do S de EA e da S. Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Patologia Clínica ou Análises Clínicas, que consta do anexo ao presente despacho e dele faz parte integrante [Internet]. *Diário da República n.º 212/2019, Série II de 2019-11-05; 2019.* p. 66–80. Available from: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/125879568/details/normal?l=1>
  38. Rosenstraus M, Wang Z, Chang S, Bonville DDE, Spadaro JP. An Internal Control for Routine Diagnostic PCR: Design, Properties, and Effect on Clinical Performance. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1998;36(1):191–7. Available from: <https://jcm.asm.org/content/36/1/191.long>
  39. Kitchin PA, Bootman JS, Centre PCRR LB. Quality Control of the Polymerase Chain Reaction. *Rev Med Virol* [Internet]. 1993;3(2):107–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/rmv.1980030207>
  40. Pelt-Verkuil Elizabeth Van, Belkum Alex Van HJP. The Use Of Positive and Negative Controls in PCR Quality. In: Springer, editor. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification* [Internet]. 2008. p. 199–201. Available from: [https://www.springer.com/gp/book/9781402062407?utm\\_campaign=3\\_pier05\\_buy\\_print&utm\\_content=en\\_08082017&utm\\_medium=referral&utm\\_source=google\\_books#otherversion=9781402062414](https://www.springer.com/gp/book/9781402062407?utm_campaign=3_pier05_buy_print&utm_content=en_08082017&utm_medium=referral&utm_source=google_books#otherversion=9781402062414)

41. QCMD. Quality control for molecular diagnostic [Internet]. [cited 2020 Jul 7]. Available from: <https://www.qcmd.org/>
42. NEQAS U. International Quality Expertise [Internet]. [cited 2020 Jul 22]. Available from: <https://ukneqas.org.uk/>
43. Saúde; SN de, INSA. Instituto Ricardo Jorge disponibiliza programa de avaliação da qualidade laboratorial do diagnóstico do SARS-CoV-2 [Internet]. 24/06/2020. [cited 2020 Jul 22]. Available from: <http://www.insa.min-saude.pt/instituto-ricardo-jorge-disponibiliza-programa-de-avaliacao-da-qualidade-laboratorial-do-diagnostico-do-sars-cov-2/>
44. Helmut J.F. Salzer a, b Guido Schäfer c, d Martin Hoenigl e, f Gunar Günther a, g Christian Hoffmann h, i Barbara Kalsdorf a, b Alexandre Alanio j–l Christoph Lange a, b M. Clinical , Diagnostic , and Treatment Disparities between HIV-Infected and Non-HIV-Infected Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Respir Int Rev Thorac Dis KARGER*. 2018;96(1):52–65.
45. Atzori C, Agostoni F, Angeli E, Mainini A, Orlando G, Cargnel A. Combined Use of Blood and Oropharyngeal Samples for Noninvasive Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia using the Polymerase Chain Reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1998;17:241–6. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01699980>
46. Hammarström H, Grankvist A, Broman I, Kondori N, Wennerås C, Gisslen M, et al. Serum-based diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* by detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA and 1, 3-  $\beta$ -D-glucan in HIV- infected patients : a retrospective case control study. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2019;19(1):658. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4289-4>
47. Wang D, Hu Y, Li T, Rong H, Tong Z. Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia with serum cell- free DNA in non-HIV-infected immunocompromised patients. *Oncotarget* [Online] [Internet]. 2017;8(42):71946–53. Available from: <https://www.oncotarget.com/article/18037/text/>
48. Skalski JH, Kottom TJ, Limper AH. Pathobiology of *Pneumocystis pneumonia* : life cycle , cell wall and cell signal transduction. *FEMS Yeast Res* [Internet]. 2015;15(6):1–12. Available from: <https://academic.oup.com/femsyr/article/15/6/fov046/634675#61605038>
49. AH. TCL. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2007;5(4):298–308. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrmicro1621>
50. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A New Name ( *Pneumocystis jirovecii* ) for *Pneumocystis* from Humans. *Centers Dis Control Prev* [Internet]. 2002;8(9):891–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12194762/>
51. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and

- colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2011;17(10):1531–7. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03400.x>
52. Avino, LJ, Naylor, SM e Roecker A. Pneumocystis jirovecii Pneumonia in the Non – HIV-Infected Population. *Ann Pharmacother* [Internet]. 2016;50(8):673–9. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/1060028016650107?journalCode=aopd#articleCitationDownloadContainer>
  53. Nevez G, Gal S Le, Noel N, Wynckel A, Huguenin A, Govic Y Le, et al. Investigation of Nosocomial Pneumocystis Infections: Usefulness of Longitudinal Screening of Epidemic and Post-Epidemic Pneumocystis genotypes. *J Hosp Infect* [Internet]. 2017;99(3):332–45. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.09.015>
  54. Sokulska M, Kicia M, Weso M, Hendrich AB. Pneumocystis jirovecii – from a commensal to pathogen: clinical and diagnostic review. *Parasitol Res* [Internet]. 2015;114(10):3577–85. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-015-4678-6#citeas>
  55. Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, et al. Current Epidemiology of Pneumocystis Pneumonia. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2004;10(10):1713–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3323247/>
  56. Morris A, Norris KA. Colonization by Pneumocystis jirovecii and Its Role in Disease. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2012;25(2):297–317. Available from: <http://cmr.asm.org/content/25/2/297.abstract>
  57. Gigliotti F, Wright TW. 251 – Pneumocystis jirovecii. In: *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* [Internet]. Fifth Edit. Elsevier Inc.; p. 1266-1270.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00251-6>
  58. HIV infection and AIDS Annual Epidemiological Report for 2017 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Contro. [cited 2020 May 23]. p. 1–7. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/hiv-infection-aids--annual-epidemiological-report-2017.pdf>
  59. Jorge. D-G da SN de SDR. Infecção VIH e SIDA em Portugal – 2019 – [Internet]. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) e a Direção-Geral da Saúde. Lisboa: DGS/INSA; 2019. 64 p. Available from: <http://www.insa.min-saude.pt/relatorio-infecao-vih-e-sida-em-portugal-2019/>
  60. Schildgen V, Mai S, Khalfaoui S, Lüsebrink J, Pieper M, Tillmann RL, et al. Pneumocystis jirovecii Can Be Productively Cultured in Differentiated CuFi-8 Airway Cells. *Am Soc Microbiol mBio* [Internet]. 2014;5(3):e01186–14. Available from: <https://mbio.asm.org/content/5/3/e01186-14.long>
  61. Thomas CF, Limper AH. Pneumocystis Pneumonia. *N Engl J Med* [Internet]. 2004;350:2487–98. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra032588>

62. Souza W De, Benchimol M. Basic biology of *Pneumocystis carinii* – A Mini Review. Scielo [Internet]. 2005;100(8):903–8. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800013%0A>
63. Salzer HJF, G Schäfer, M Hoenigl, G Günther, C Hoffman, B Kalsdorf, A Alanio CL. Clinical , Diagnostic , and Treatment Disparities between HIV-Infected and Non-HIV-Infected Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Respiration* [Internet]. 2018;96(1):52–65. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29635251?dopt=Abstract>
64. SILVA MCNF da CH da. Estudo da resistência de *Pneumocystis jirovecii* ao cotrimoxazol em doentes com infecção VIH SIDA [Internet]. Repositorio Universitário Nova. Instituto de Higiene e Medicina Tropical Universidade Nova de Lisboa; 2008. Available from: <http://hdl.handle.net/10362/56914>
65. Corsi-Vasquez G, Ostrosky-Zeichner L, Pilkington EF SP. crossm Point-Counterpoint: Should Serum <sup>13</sup>C - D -Glucan Testing Be Used for the Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia ? *J Clin Microbiol* [Internet]. 2019;58(1):1–7.
66. White PL, Backx M, Barnes RA, White PL, Backx M, Barnes RA. Expert Review of Anti-infective Therapy Diagnosis and management of *Pneumocystis jirovecii* infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2017;15(5):435–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1305887>
67. Moodley B, Tempia S, Freaan JA. Comparison of quantitative real-time PCR and direct immunofluorescence for the detection of *Pneumocystis jirovecii*. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180589.
68. Cabaret O, Cordonnier C, Costa J, France I De. Clinical Significance of Quantifying *Pneumocystis jirovecii* DNA by Using Real-Time PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid from. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2012;50(2):227–31. Available from: <https://jcm.asm.org/content/50/2/227#skip-link>
69. Hauser PM, Bille J, Lass-flo C, Geltner C, Feldmesser M, Levi M, et al. Multicenter , Prospective Clinical Evaluation of Respiratory Samples from Subjects at Risk for *Pneumocystis jirovecii* Infection by Use of a Commercial Real-Time PCR Assay †. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1872–8.
70. Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf J. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by Two Staining Methods and Two Quantitative PCR Assays. 2009;37(3):261–5.
71. Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Gant V, Novak T, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *BMJ Thorax* [Internet]. 2008;63(2):154–9. Available from: <https://doi.org/10.1136/thx.2007.081687>
72. Kaiser K, Rabodonirina M, Cotte L. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in Blood Specimens from

- Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients by Nested PCR. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1999;37(1):127–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9854076/>
73. Lu J, Chen C, Bartlett MS, Smith JW, Lee C. Comparison of Six Different PCR Methods for Detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1995;33(10):2785–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC228578/>
74. Biosystems A. Sistema de PCR em tempo Real ABI PRISM® 7 7000:Guia do Usuário. Vol. 67. 2002.

## Anexo

Anexo 1 Lista de Bactérias e Vírus, pesquisados no laboratório de biopatologia molecular do CHUSJ

Bactérias	Vírus
<i>Acanthamoeba spp</i>	Adenovirus
<i>Bartonella spp</i>	Bocavirus
<i>Bordetella pertussis e parapertussis</i>	Enterovirus
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Hantavirus
<i>Brucella spp</i>	HPV6/11
<i>Burkholderia cepacia</i>	Metapneumovirus
<i>Campylobacter spp</i>	Norovirus
<i>Chamydia spp</i>	Parechovirus
<i>Clostridium difficile</i>	Parvovirus B19
<i>Coxiella Burnetii</i>	Rhinovirus
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Virus BK
<i>Francisella tularensis</i>	Chikungunya
<i>Haemophilus spp</i>	Citomegálico
<i>Helicobacter pylori</i>	Coriomeningite linfocítica
<i>Helicobacter pylori (resistência claritromicina)</i>	Dengue

<i>Kingella kingae</i>	<i>Epstein-Barr</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Hepatite E</i>
<i>Leptospira spp</i>	<i>Herpes<sub>1,2</sub></i>
<i>Listeria spp</i>	<i>Herpes<sub>6,7,8</sub></i>
<i>Mycobacterium spp</i>	<i>Influenza A e B</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis(complex)</i>	<i>Virus JC</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Vírus molluscum Contangiosum</i>
<i>Neisseria spp</i>	<i>Parotidite</i>
<i>Nocardia spp</i>	<i>Ruéola</i>
<i>Rickettsia spp</i>	<i>Sarampo</i>
<i>Rickettsia conorii</i>	<i>Sincicial Respiratório</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Virus da Toscana</i>
<i>Tropheryma Whipplei</i>	<i>Varicella-Zoster</i>
<i>Treponema pallidum</i>	<i>West Nile</i>
<i>Yersinia spp</i>	

Anexo 2 Lista de Bactérias e Vírus, pesquisados no laboratório de biopatologia molecular do CHUSJ

<b>1. Fungos</b>	<b>Parasitas</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Acanthamoeba Spp</i>
<i>Candida Albicans</i>	<i>Ballamuthia mandrillaris</i>
<i>Histoplasma</i>	<i>Entamoeba Hystolitica</i>
<i>Microsporidium Spp</i>	<i>Leishmania Infantum</i>
<i>Pneumocystis Jiroveci</i>	<i>Naegleria</i>
	<i>Plasmodium (Falciparum, Vivax, Ovale, Malariae)</i>

Anexo 3 Protocolo de Pré-tratamento da Urina

Microrganismo		Procedimentos		
		Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Bactérias	<i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Neisseria Gonorrhoeae</i> , <i>Mycobacterium</i>	Concentração de amostrar a 3 000 rotação por minuto por 15 minutos.	1º Digestão do pellet 2º Banho a seco a 56°C	Extração do DNA ou RNA no aparelho EZ1 com o kit vírus mini v2.0
	<i>Leptospira</i>	1º Concentração de amostrar a 1 500 rotação por minuto. 2º Concentração do sobrenadante a 13 500 rotações por minuto por 15 minutos		
Vírus	<i>Cytomegalovirus</i> <i>Adenoviridae</i>	Concentração de amostrar a 3 000 rotação por minuto por 15 minutos		
	<i>BKV</i> <i>JC</i>	Separação de 400 µl da amostra, para extração direta do ácido nucleico		
Parasitas	Toxoplasma	1º Separação de 400 µl da amostra, para extração direta do ácido nucleico, 2º Concentração de amostrar a 3 000 rotação por minuto por 15 minutos, para uso do buffy coat		

Anexo 4 Protocolo de Pré-tratamento de amostras respiratórias

Microrganismo	Procedimentos			
Bactérias	<i>Bortella pertussis</i> , <i>Bortela parapertussis</i> , <i>Chlamydia pneumonia</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>legionella penumonia</i> <i>Chlamydophila psittaci</i>	<b>Etapa 1</b> 1º Fluidificação da amostra com n-l-cysteina; 2º Centrifugação da amostra a 3 000 rotações por minuto a 15 minutos	<b>Etapa 2</b> 1º Digestão do pellet 2º Banho a seco a 56ºc	<b>Etapa 3</b> Extração no aparelho EZ1 advance com o protocolo tecidos
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1º Concentração de 2ml amostra previamente descontaminada a 15 500 rotações por minuto por 15 minutos	Banho seco a 95ºc por 30 minutos do pellet	Extração no aparelho QiAcube com o protocolo de DNA e kit DNA mini
Vírus	<i>Bocavírus</i> , <i>Rhinovirus</i> , <i>Adenovirus CMV</i> , <i>HSV1 e2 Influenza A/B</i>	1º Fluidificação da amostra com n-l-cysteina; 2º Centrifugação da amostra a 3 000 rotações por minuto a 15 minutos.	1º Digestão do pellet 2º Banho a seco a 56ºc	Extração da amostra no aparelho EZ1 com o kit vírus mini v2.0
Fungos	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1º Fluidificação da amostra com n-l-cysteina; 2º Centrifugação da amostra fluidificada a 3 000 rotações por minuto por 15 minutos 3º incubação da amostra 45 minutos a 37ºc com lyticase	1º Centrifugação a 5 600 rotações por minuto por 10 minutos 2º Digestão do pellet 3º Banho a seco a 56ºc	Extração no aparelho EZ1 advance com o protocolo tecidos

Anexo 5 Protocolo de Pré-tratamento de amostras de sangue

Microrganismo	Procedimentos		
Bactérias	<i>Rickettsia spp,</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Bucella</i>	1ºCentrifugação da amostra de sangue por 15 minutos a 3 000 rpm. 2º Separar 400 µl do plasma	Extração no aparelho EZ1 advance com o protocolo vírus
	<i>Bartonella</i>	1ºCentrifugação da amostra a 3 000 rpm por 15 minuto; 2ºSeparação de 400 µl do plasma;  3º Ainda com a mesma amostra faz-se a digestão do buffy coat com Proteinase K a 56ºc	Extração do plasma é feita no aparelho EZ1 com o kit vírus mini 2.o, enquanto que para o buffy coat é utilizado o kit tecidos
Vírus	<i>EBV, BKV, HSV8,</i> <i>Adenovírus</i>	Extração é feita partir de 200 µl do sangue total.	Extração da amostra no aparelho EZ1 com o kit Sangue
	<i>CMV, JC, HSV1,</i> <i>HSV2, HSV6, HSV7,</i> <i>Enterovírus, PVB19,</i> <i>Rubella,</i> <i>Morbillivirus</i>	1ºCentrifugação a amostra de sangue por 15 minutos a 3.000 rpm. 2º Separar 200/400 µl do plasma.	Extração da amostra no aparelho EZ1 com o kit vírus mini 2. o
Fungos	<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Candida albicans</i>	1ºAdição de 10 ml de água à amostra com o objetivo de provocar lise às células presentes no sangue,  2º Centrifugação a amostra de sangue por 15 minutos a 3.000 rpm,  3º Lavagem do sedimento com tris EDTA e Centrifugação a amostra de sangue por 15 minutos a 13.500 rpm  4ºIncubação da amostra com lyticase a 37ºc por 45 minutos, 5º Centrifugação da amostra a uma rotação de 5.200 rpm,	Extração no aparelho EZ1 advance com o protocolo tecidos

		6º Digestão do pellet com a proteinase K,	
--	--	---	--

Anexo 6 Protocolo de Pré-tratamento do Líquido Cefalorraquidiano

Microrganismo	Procedimentos		
Bactérias	<p><b>Mycobacterium tub. Treponema, Leptospira</b></p>	<p>1ºCentrifugação a amostra por 15 minutos a 13500 rotações por minuto. 2º Digestão da amostra no banho seco a 56ºC. 3ºNo caso da Mycobacterium Tub., depois da digestão faz se a incubação a 95ºC por 30 minutos.</p>	<p>Extração no aparelho EZ1 advance com o protocolo de DNA tecidos.  A extração da Mycobacterium Tub. é feita no aparelho QiAcube</p>
	<p>Mycoplasma pneumoniae, Neisseria meningitidis ou Meningococo, Coxiella, Rickettsia,</p>	<p>Extração direta a partir de 200 µl de amostra, e levado a extrair</p>	<p>Extração no aparelho EZ1 advance com o protocolo de DNA tecidos. kit tecidos</p>
Vírus	<p><i>EBV, W. Nile, HSV1e2 Adenovirus, enterovirus CMV, JC, HSV6, HSV7, Enterovirus, PVB19</i></p>	<p>Extração é feita a partir de 400 µl da amostra</p>	<p>Extração da amostra no aparelho EZ1 com o kit vírus mini 2.0</p>

Parasita	<i>Toxoplasma</i>		Extração da amostra no aparelho EZ1 com o kit vírus mini 2.0
----------	-------------------	--	--

Anexo 7 Procedimentos para extração em Biópsias

Microrganismos		Procedimentos		
		Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Vírus	JC; PVB19; Adenovírus; CMV, EBV, HSV1e2, Enterovírus, Rubéola, HSV8,		No caso do MTB após a digestão, é feita a incubação da amostra por 30 minutos a banhos a seco de 95 <sup>o</sup> c, a extração é feita no aparelho QiAcube com o protocolo DNA bactérias	Extração da amostra no aparelho EZ1 com o kit vírus mini 2. o
Bactérias	Bartonella spp, Rickettsia spp, Borrelia, Tropheryma W., MTB	1 <sup>o</sup> Fragmentação da amostra.		
Fungos	Aspergillus fumigatus Candida Albicans <i>Pneumocystis jirovecii</i>	2 <sup>o</sup> Digestão da amostra com proteinase K e	3 <sup>o</sup> Incubação da amostra a 37 <sup>o</sup> c com liticase por 45 minutos 4 <sup>o</sup> Centrifugação da amostra por 10 minutos a 5600 rotações por minuto	Extração a partir de 200 µl do pellet obtido, no aparelho EZ1 com o kit tecidos
Parasitas	Toxoplasma g. Leishmania infant	banho a 56 <sup>o</sup> c	3 <sup>o</sup> Incubação da amostra a 95 <sup>o</sup> c por 15 minutos	Extração no equipamento EZ1 com o kit tecidos

Anexo 8 Protocolo de Pré-tratamento de Zaragatoas

Microrganismos		Procedimentos		
		Etapa 1	Etapa 2	Etapa 3
Vírus	<i>PVB<sub>19</sub></i> ; <i>CMV</i> , <i>HSV<sub>1e2</sub></i> , <i>Enterovírus</i> , <i>Rubéola</i> , <i>HPV<sub>16e18</sub></i> , <i>Morbillivirus</i>	1º digestão da amostra colhida na zaragatoa com 290 µl por 15 minutos a 56ºc a banho seco	2º no caso das MTB, após a digestão é feita a incubação por 30 minutos a 95ºc	2º Extração da amostra aparelho EZ1 com o kit vírus mini 2. o
Bactérias	<i>Neisseria G.</i> , <i>Chlamdia</i> <i>Trachomats</i> , <i>Bartonella spp.</i> , <i>Treponema pallidum</i> , <i>Francisella T.</i> <i>Haemophilus ducreyi</i> <i>MTB</i>			Extração no aparelho EZ1 com o kit tecidos. No caso do MTB a extração é no aparelho Qiacube no protocolo DNA bactérias
Parasitas	<i>Toxoplasma g.</i> <i>Acanthamoeba spp.</i> , <i>Trichomonas vaginallis</i>		2º Incubação da amostra por 15 minutos a 95ºc	Extração no aparelho EZ1 com o kit tecidos

Anexo 9 Protocolo de Pré-tratamento de Líquidos biológicos

Microrganismo		Procedimentos	
Vírus	CMV, EBV, InfA/B, HSV6, Enterovírus, Adenovirus, HSV8	1º Fluidificação da amostra	2º Extração da amostra aparelho EZ1 com o kit vírus mini 2. o
Bactérias	Borrelia burgorferi, Chlamydia pneumonia, Legionella pneumofila, Mycoplasma pneumonia Neisseria Gonorreia MTB	No caso do MTB, após a digestão, incubação da amostra por 30 minutos a 95ºc	No caso do MTB a extração é no aparelho Qiacube
Fungos	Aspergillus fumigetus Candida Albicans Pneumocystis jiroveci	2º Centrifugação por 15 minutos a 3000 rotações por minuto 3º Incubação do pellet com liticase por 45 minutos a 37ºc	Extração da amostra aparelho EZ1 com o kit tecidos
Parasitas	Entamoeba Hystolitica	1º Fluidificação da amostra	

Anexo 10 Protocolo de Pré-tratamento de Medula Óssea

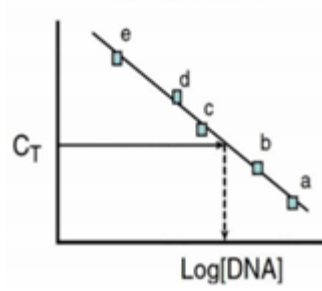
Microrganismo		Procedimentos	
Vírus	CMV, PVB <sub>19</sub> , HSV <sub>6e7</sub> , HSV <sub>1e2</sub> , EBV, HHV <sub>8</sub>	1º extração direta de 200 µl de amostra	2º Extração da amostra aparelho EZ1 com o kit blood
Parasitas	Leishmania infantum Toxoplasma Trypanosoma B.		
Fungos	Aspergillus fumigetus Candida Albicans	1º Lisar as células vermelhas com H <sub>2</sub> O; 2º Centrifugação por 15 minutos a 3.000 rpm 3º Incubação a 37ºc por 45 minutos com liticase	Extração da amostra aparelho EZ1 com o kit tecidos

		4º Digestão da amostra com PK	
<b>Bactérias</b>	<i>Brucella spp</i> <i>Coxiella B.</i> <i>MTB</i>	1ºLisar as células vermelhas com H <sub>2</sub> O; 2ºCentrifugação por 15 minutos a 3.000 rpm  2º Digestão a 56ºc com PK No caso do MTB, após a digestão incubação por 30 minutos a 95ºc.	3ºExtração da amostra aparelho EZ1 advance com o protocolo de DNA tecidos. No caso do MTB a extração é no aparelho Qiacube

*Anexo 11 Protocolo de Pré-tratamento de Fezes*

<b>Microrganismo</b>		<b>Procedimento</b>	
<b>Vírus</b>	<b>CMV, Enterovírus, Adenovírus, Norovírus</b>	1ºSuspensão da amostra em Tris de EDTA 2ºCentrifugação por 5 minutos a 800 rotações por minuto	Extração a partir de 400µl do sobrenadante, no aparelho EZ1 com o kit vírus mini 2. o
<b>Bactérias</b>	<i>Clostridium difficile</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Helicobacter pylori</i>	1ºSuspensão de mais ou menos 180-220 mg de fezes com tampão InhibitEX fornecido no kit de extração 2ºVortexar por 1 minuto até ficar homogêneo 3ºIncubação da amostra por 5 minutos a 95ºc 4ºCentrifugar a amostra a 13.500 rpm por 1 minuto.	Extração de DNA é feita a partir de 350 µl do sobrenadante, no aparelho QiAcube com o protocolo de fezes.
<b>Fungos</b>	<i>Microsporidium spp</i>	5º Incubação d de 350 µl do sobrenadante com lyticase por 45 minutos a 37ºc 6ºCentrifugação por 10 minutos a 5 600 rpm	Extração de DNA é feita a partir de 350 µl do sobrenadante, no aparelho QiAcube com o protocolo de fezes.

Anexo 12 Curva Padrão obtido por sucessiva análise de amostras com concentrações de DNA conhecidas. Adaptado de Bulter, 2005



Anexo 13 Diferentes tipos de PCR, Kit Comercial e métodos utilizados para identificação dos microrganismos nas infeções Bacterianas

	<b>Microrganismo</b>	<b>Tipo de PCR</b>	<b>Método de deteção</b>	<b>Kit Comercial/ In house</b>
<b>Bactérias</b>	<i>Acanthamoeba spp</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Bartonella spp</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Bordetella pertussis e parapertussis</i>	PCR em tempo real	<i>Sybergreen</i>	<i>in house</i>
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	Kit Comercial-BactoReal Kit
	<i>Brucella spp</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Campylobacter spp</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	Kit Comercial

	<i>Clostridium difficile</i>	PCR em tempo real	<i>Sybergren</i>	<i>in house</i>
	<i>Coxiella Burnetii</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Francisella tularensis</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Haemophilus influenza</i>	PCR em tempo real-	<i>Sybergren</i>	<i>in house</i>
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Helicobacter pylori</i> (resistência claritromicina)	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	Kit Comercial
	<i>Kingella kingae</i>	PCR em tempo real	<i>Sybergren</i>	<i>in house</i>
	<i>Legionella pneumophila</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	Kit comer- kit respiratorio seegen
	<i>Leptospira spp</i>	PCR em tempo real	<i>Sybergren</i>	<i>in house</i>

<i>Listeria spp</i>	PCR em tempo real	<i>Sybergren</i>	<i>in house</i>
<i>Mycobacterium spp</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (complex)	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>Kit Comercial</i>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	PCR em tempo real	<i>Sybergren</i>	<i>in house</i>
<i>Neisseria spp</i>	PCR em tempo real	<i>Sybergren</i>	<i>in house</i>
<i>Nocardia spp</i>	PCR em tempo real	<i>Sybergren</i>	<i>in house</i>
<i>Rickettsia spp</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
<i>Rickettsia conorii</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
<i>Tropheryma Whipplei</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	Comercial

	<i>Treponema pallidum</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Yersinia spp</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	<i>in house</i>
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PCR em tempo real	Sonda <i>TaqMan</i>	Kit Comercial

*Anexo 14 Diferentes tipos de PCR, Kit Comercial e métodos utilizados para identificação dos microrganismos nas infecções Virais*

<b>Vírus</b>	<b><i>Adenovirus</i></b>	<b>PCR em tempo real</b>	<b>Taqman</b>	<b><i>in house</i></b>
	<i>Bocavirus</i>	PCR em tempo real	Taqman	<i>in house</i>
	<i>Enterovirus</i>	PCR em tempo real-RT	Taqman	<i>in house</i>
	<i>Hantavirus</i>	PCR em tempo real-RT	Taqman	<i>in house</i>
	<i>HPV</i>	PCR em tempo real	Taqman	Kit Comercial
	<i>Metapneumovirus</i>	PCR em tempo real-RT	Taqman	Kit Comercial-seegen
	<i>Norovirus</i>	PCR em tempo real-RT	Taqman	Kit Comercial-seegen
	<i>Parechovirus</i>	PCR em tempo real-RT	Taqman	<i>in house</i>

<i>Parvovirus B19</i>	PCR em tempo real	Taqman	Kit comercial- qiagen
<i>Rhinovirus</i>	PCR em tempo real-RT	Taqman	Kit Comercial-seegen
<i>Virus BK</i>	PCR em tempo real	Sybergreen	<i>in house</i>
<i>Chikungunya</i>	PCR em tempo real	Taqman	Kit Comercial-seegen
<i>Citomegálico</i>	PCR em tempo real	Taqman	Kit Comercial- biomerieux
<i>Coriomeningite linfocítica</i>	PCR em tempo real-RT	Taqman	<i>in house</i>
<i>Dengue</i>	PCR em tempo real-RT	Sybergreen	<i>in house</i>
<i>Epstein-Barr</i>	PCR em tempo real	<i>Sonda Taqman</i>	Kit qiagen
<i>Hepatite E</i>	PCR em tempo real-RT	<i>Sonda Taqman</i>	<i>in house</i>
<i>Herpes<sub>1,2</sub></i>	PCR em tempo real multiplex	Sondas de hidrolise	Kit comercial Roche
<i>Herpes<sub>6,7,8</sub></i>	PCR em tempo real multiplex	Sybergren	<i>in house</i>
<i>Influenza A e B</i>	PCR em tempo real-RT	Taqmn	Kit Comercial-Seegen
<i>Virus JC</i>	pCR em tempo real	Syberg	<i>in house</i>

	<i>Vírus molluscum Contangiosum</i>		Sonda Taqman	<i>in house</i>
	<i>Parotidite</i>	RT-PCR	Sonda Taqman	FDT
	<i>Ruéola</i>	RT-PCR	Sonda Taqman	FDT
	<i>Sarampo</i>	RT-PCR	Sonda Taqman	FDT
	<i>Sincicial Respiratório</i>	RT-PCR	Sonda Taqman	<i>in house</i>
	<i>Virus da Toscana</i>	RT-PCR	SYBERGREN	<i>in house</i>
	<i>Varicella-Zoster</i>	RT-PCR	Sonda Taqman	Kit Comercia
	<i>Zika</i>	RT-PCR	Sonda Taqman	Ki Comercial- Genesig
	<i>West Nile</i>	RT-PCR	Sonda Taqman	Ki Comercial- Genesig

Anexo 15 Diferentes tipos de PCR, Kit Comercial e métodos utilizados para identificação dos microrganismos nas infecções Fúngicas

Fungos	<i>Aspergillus fumigatus</i>	pcr-tempo real	Taqman	Kit Comercial
	<i>Candida Albicans</i>	pcr-tempo real	Sybergren	<i>in house</i>
	<i>Histoplasma</i>	pcr-tempo real	Taqman	<i>in house</i>
	<i>Microsporidium Spp</i>	pcr-tempo real	Taqman	<i>in house</i>
	<i>Pneumocystis Jiroveci</i>	pcr-tempo real	Sybergreen	<i>in house</i>

Anexo 16 Diferentes tipos de PCR, Kit Comercial e métodos utilizados para identificação dos microrganismos nas infecções Parasitarias

<b>Parasitas</b>	<b><i>Acanthamoeba Spp</i></b>	<b>PCR em tempo real</b>	<b><i>Sonda Taqman</i></b>	<b><i>in house</i></b>
	<i>Ballamuthia mandrillaris</i>	PCR em tempo real	<i>Sonda Taqman</i>	<i>in house</i>
	<i>Entamoeba Hystolitica</i>	PCR em tempo real	<i>Sonda Taqman</i>	<i>in house</i>
	<i>Leishmania Infantum</i>	PCR em tempo real	<i>Sonda Taqman</i>	<i>in house</i>
	<i>Naegleria</i>	PCR em tempo real	<i>Sonda Taqman</i>	<i>in house</i>
	<i>Plasmodium (Falciparum, Vivax, Ovale, Malariae)</i>	PCR em tempo real	<i>Sonda Taqman</i>	<i>in house</i>
	<i>Toxoplasma</i>	PCR em tempo real	<i>Sonda Taqman</i>	<i>in house</i>