

Ácidos nucleicos como metodologia de diagnóstico em doenças sexualmente transmissíveis

Humberto Abrão¹

O desafio de se identificar organismos patogênicos diretamente das amostras clínicas de uma maneira rápida e precisa sempre foi o grande desafio dos microbiologistas. Isto minimizaria os sofrimentos dos pacientes, orientaria adequadamente o tratamento, o que diminuiria a propagação de infecções, além de fornecer dados epidemiológicos reais.

Após muitos esforços e o desenvolvimento da tecnologia de recombinantes de DNA foi possível a produção das sondas de DNA e consequentemente a hibridização molecular como metodologia de diagnósticos.

Fundamentos

Para se compreender a técnica de hibridização é fundamental conhecer a estrutura dos ácidos deoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA). O DNA é constituído de uma dupla hélice (duas cadeias), enquanto o RNA é essencialmente constituído de uma única cadeia (apesar de existirem alguns vírus, os reovírus, que contêm dupla cadeia de RNA). Estas cadeias, tanto de DNA e RNA, podem ser separadas por calor ou usando agentes

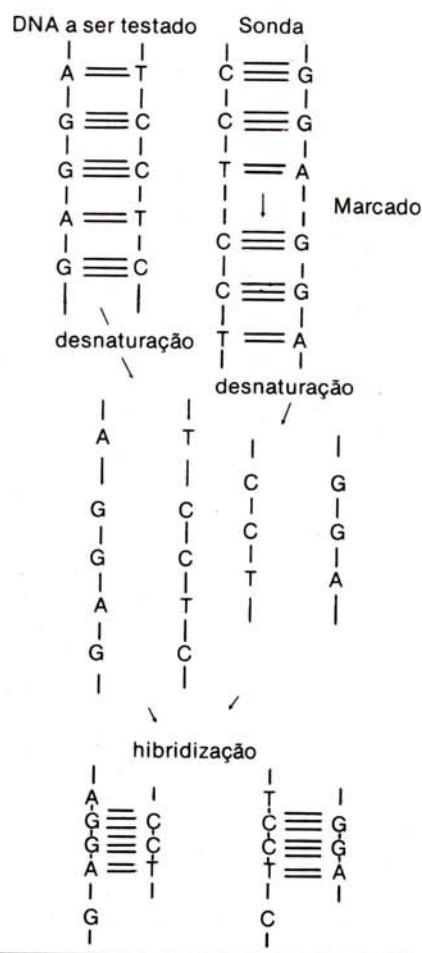
químicos, como NaOH, num processo que é denominado desnaturação.

Uma vez que cada espécie, classificada adequadamente, tem alguma seqüência única de nucleotídeos que a distingue de todas as outras espécies, cada composição genética dos microorganismos é como uma "impressão digital", que pode ser usada em sua identificação. A identificação correta destas seqüências únicas de nucleotídeos se faz através das sondas de DNA na hibridização molecular. Achave para se desenvolver uma sonda de ácido nucleico (sonda de DNA ou de RNA) é isolá-las seqüências exclusivas, reproduzi-las em grandes quantidades e acoplar a elas uma molécula marcadora para que elas então possam ser incorporadas em uma reação de hibridização.

As sondas de DNA são pedaços de ácidos nucleicos marcados de alguma maneira que podem reconhecer e ligar a pedaços de DNA ou RNA (que estão nas amostras a serem estudadas) que têm seqüências de nucleotídeos complementares, como se fossem as duas partes de um zíper. Uma vez que ocorre esta reação, usa-se um sistema de revelação que pode ser radioativo ou colorimétrico (enzima). Portanto, hibridização é o processo pelo qual duas cadeias (ou fragmentos) de ácido nucleico se juntam para formar uma molécula de cadeia dupla estável. Uma vez que as seqüências de bases ao longo de ca-

da trecho são complementares elas se ligarão e ficarão juntas (unidas).

Fig. 1 — Fundamentos da técnica de hibridização



¹Diretor para o Brasil do Grupo de Estudos de Laboratório das DST da União Latino-Americana contra as Enfermidades de Transmissão Sexual — ULACETS — Diretor do Departamento de Doenças Sexualmente Transmissíveis da Fundação Libanesa de Minas Gerais — FULIBAN — Fellow of the American Society for Microbiology

Sondas

Tanto o DNA como o RNA podem ser usados como uma sonda.

Ambos ácidos nucleicos são extraídos diretamente, em quantidades suficientes, dos microorganismos patogênicos, desde que existam sistemas de cultivos adequados para propagar estes microorganismos.

Se nenhum sistema de cultura é disponível, como é o caso dos papilomavírus humanos e o vírus da hepatite, uma outra maneira deve ser escolhida. Neste caso, o ácido nucleico destes vírus é amplificado em vetores de origem bacteriana ou eucariótica. Teoricamente, qualquer ácido nucleico pode ser propagado para uma quantidade que permita usá-lo como uma sonda.

Atualmente é possível sintetizar ácidos nucleicos em equipamentos computadorizados, facilitando bastante a difusão desta metodologia para uma rotina laboratorial.

O DNA é mais freqüentemente usado como uma sonda do que o RNA, porque ele é menos suscetível a degradação pelas nucleases. Quando apenas o RNA é conhecido, sua seqüência tem de ser convertida em DNA através de uma enzima chamada "transcriptase reversa" e este DNA assim obtido é denominado cDNA.

Marcação e detecção das sondas

Sistemas radioativos

Tradicionalmente o sistema de detecção mais comumente usado para revelar as razões de hibridização eram os radioisótopos, como: ^{3}H , ^{35}S , ^{32}P e ^{125}I diretamente incorporados dentro da sonda. Depois da hibridização, a ligação da sonda de DNA ao seu alvo era detectada pela auto-radiografia, isto é, cobrindo a amostra examinada com um filme de raio X ou usando um contador de cintilação.

Este método tem alta sensibilidade, detectando até 1 picograma (pg) de DNA. Como toda metodologia que usa radioisótopos, esta também apresenta desvantagens: manuseio de material radioativo, riscos para a segurança dos profissionais que lidam com estes materiais, meia vida curta e necessidade de equipamentos e reveladores especiais que elevam muito os custos destes exames.

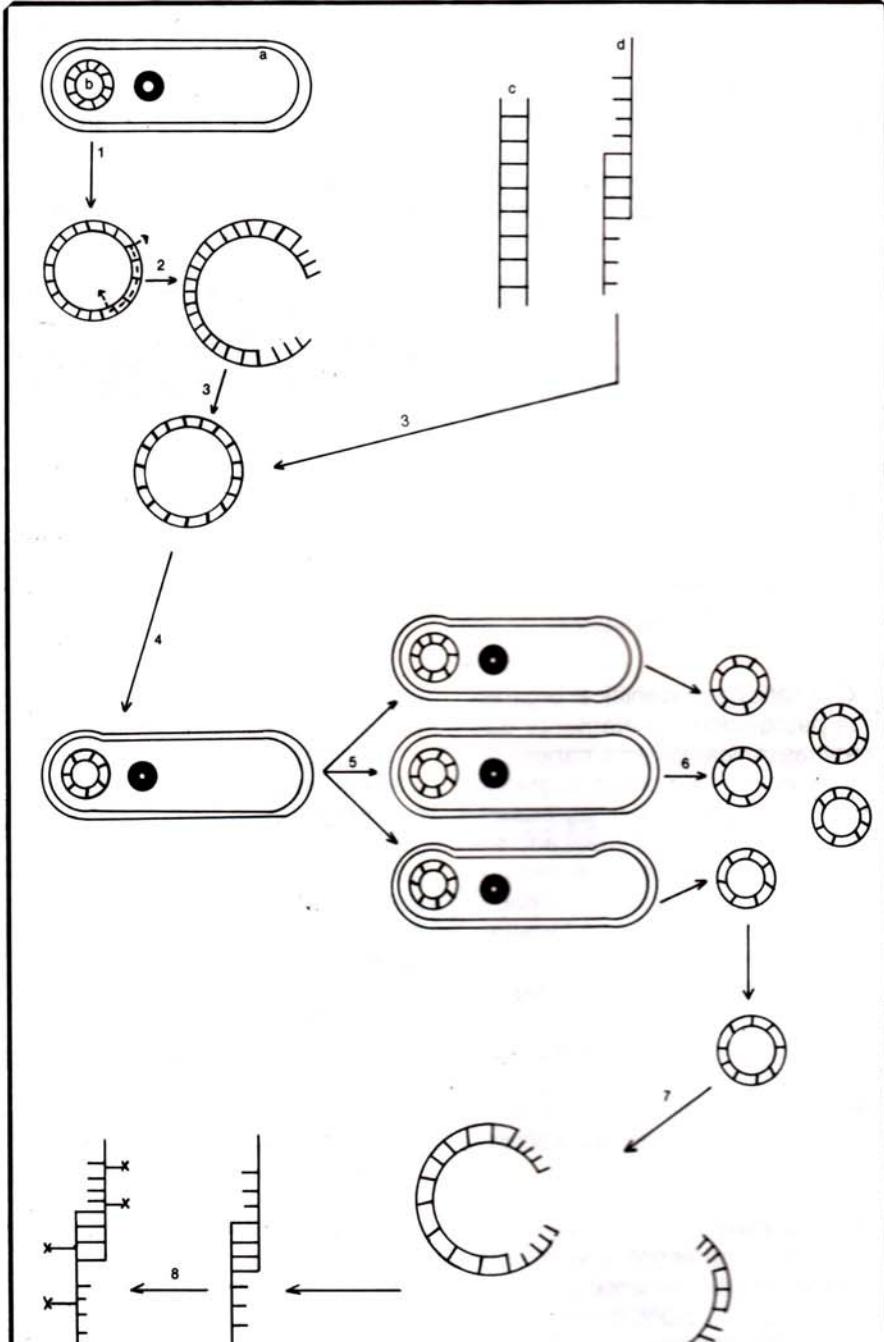


Fig. 2 — Esquema da produção das sondas de DNA

a. *Escherichia coli* usada como vetor para produção das sondas

b. Plasmídios

c e d. Fragmentos de DNA que queremos reproduzir (seqüência exclusiva) de algum agente patógeno.

1. retirada do plasmídio da bactéria

2. abertura (através de enzima endonuclease) do plasmídeo

3. fusão (através de enzima ligase) do fragmento de DNA que queremos replicar ao plasmídeo

4. recolocação do plasmídeo fundido na bactéria

5. replicação da bactéria através de cultivos na presença de antibióticos que vão favorecer a replicação das bactérias com plasmídios

6. extração dos plasmídios das bactérias

7. usando enzimas endonucleases, abertura dos plasmídios e extração dos fragmentos de DNA produzidos em grandes quantidades

8. marcação das sondas (fragmentos de DNA) para utilização nas reações de hibridizações

Sistemas biotina-avidina

Esforços para usar marcadores não radioativos nas hibridizações desenvolveram novos sistemas. No momento, o processo biotina é usualmente escolhido por uma série de vantagens. Ao contrário das sondas radioativas, ela é bastante estável, mantendo sua atividade sem perda de sensibilidade por longos períodos.

Em princípio este sistema consiste das seguintes etapas. Uma base (uracil) modificada pela biotina é incorporada no ácido nucleico. A biotina tem uma alta afinidade pela streptavidina, uma proteína isolada do *Streptomyces*. Durante a reação, a biotina e a streptavidina formam um complexo estável. Uma enzima que está ligada com a streptavidina catalisa a reação produzindo um precipitado corado depois da adição do substrato. Este precipitado corado se forma em todos os locais onde uma dupla hélice se formou previamente, e tem como grande vantagem poder ser visualizado (identificado) através de uma microscopia normal. Este sistema é bastante sensível e alguns estudos já têm conseguido detectar 32 fentogramas (fg) de DNA alvo purificado.

Diferentes variantes da técnica de hibridização

O princípio básico é sempre o mesmo, o que varia é a maneira como se apresenta o DNA alvo à sonda. As reações de hibridização aplicáveis em laboratórios clínicos podem ser realizadas em uma das quatro maneiras: sobre um suporte sólido, em solução, *in situ* ou usando processo de hibridização Southern após eletroforese em gel.

Dot blot (suporte sólido)

É a hibridização realizada em suporte sólido que pode ser membrana de náilon ou nitrocelulose. É simples, pois não requer extração dos ácidos nucleicos e pode ser realizada diretamente em células intactas e fluidos corpóreos (Fig. 3).

Em solução

Nesta técnica, tanto ácidos nucleicos alvo e sonda estão livres para se moverem, aumentando as chances de que sequências complementares se alinhem e liguem. Hibridizações em soluções se completam cinco a

Fig. 3 — Esquema da hibridização dot-blot

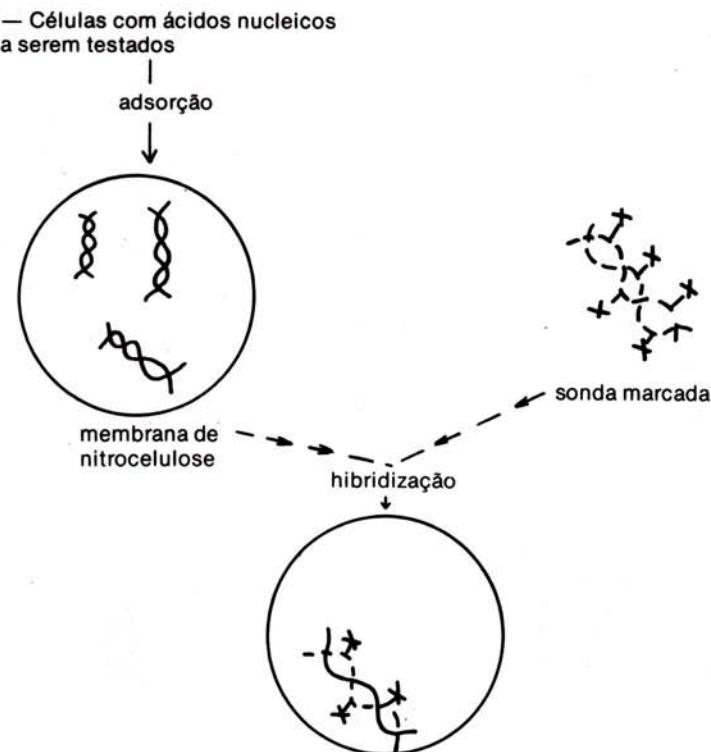
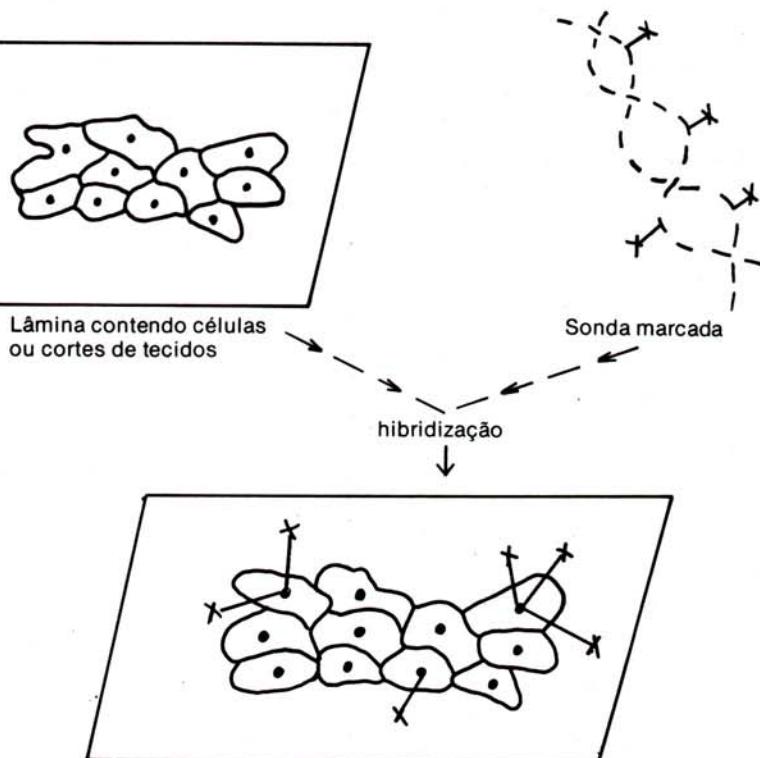


Fig. 4 — Esquema de hibridização *in situ*



10 vezes mais rapidamente do que as realizadas em suportes sólidos.

In situ

Na maioria dos casos a hibridização *in situ* é realizada em tecidos (cortes) embebidos em parafina e fixados em formalina ou raspados de células ou microorganismos fixados sobre uma lâmina. Esta técnica tem sido muito útil para a detecção de patógenos virais. Ela permite examinar o tecido primeiro pelos métodos de colorações tradicionais, como hematoxilina-eosina, e então correlacionar a citopatologia observada com a presença de agentes infecciosos (Fig. 4).

Southern blot

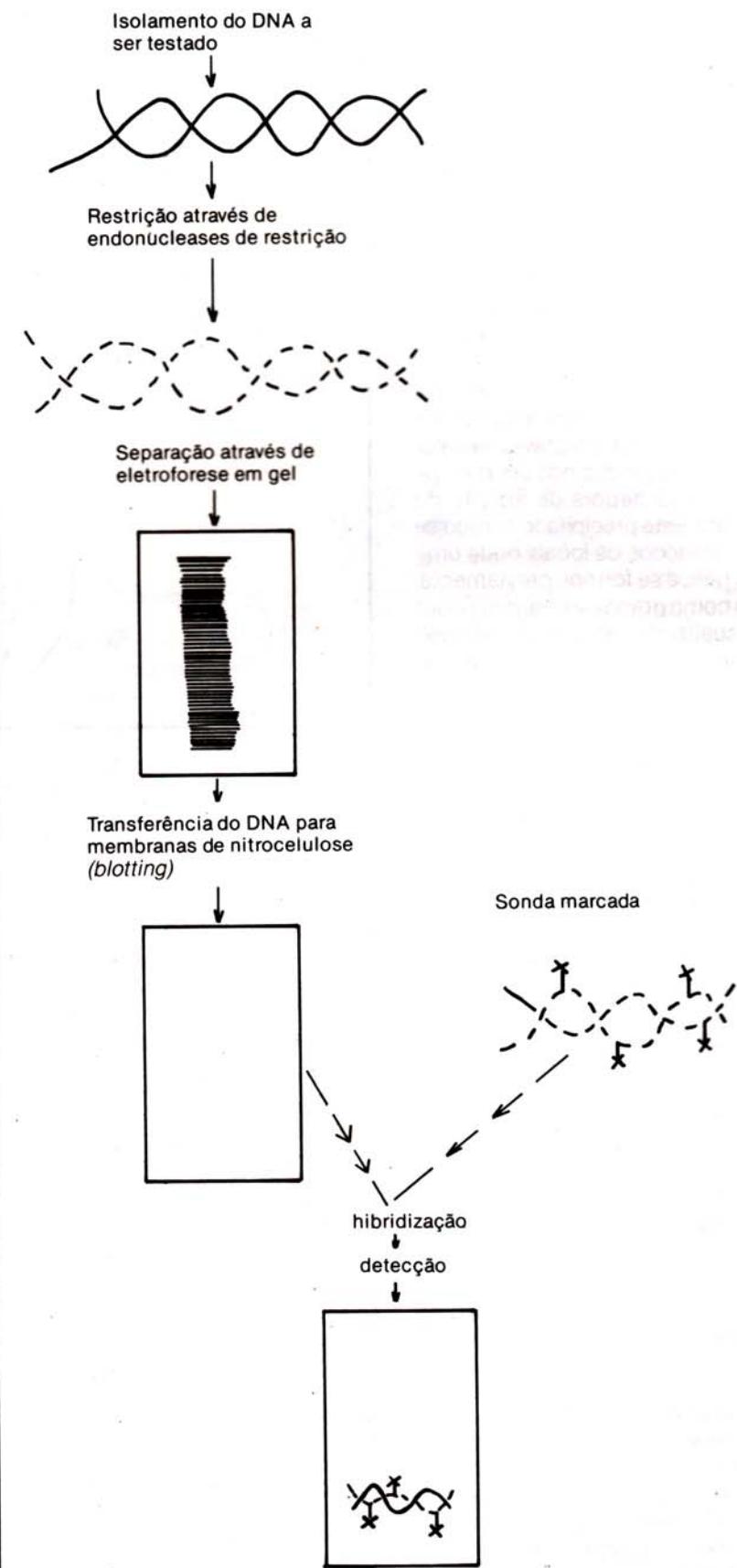
Técnica que tem o nome de seu inventor, Southern. Nesta técnica, o DNA a ser analisado é fragmentado por enzimas de restrição e os fragmentos são separados de acordo com seu peso molecular pela eletroforese em gel. O gel é tratado com álcali para desnaturar o DNA, que é transferido para uma membrana de náilon ou nitrocelulose e tratada com uma sonda (Fig. 5).

Aplicações

Virologia

Técnicas convencionais de virologia para identificação viral são isolamento do vírus e uma variedade de testes sorológicos. O isolamento do vírus requer o cultivo de diversas linhas de células diferentes em um laboratório porque nem todos os vírus crescem nas mesmas células. Este processo é demorado, pois alguns dias são necessários para isolar e identificar o vírus. Além disto, alguns vírus, como o da hepatite e o papilomavírus, não crescem nos sistemas celulares disponíveis. As técnicas de isolamento e sorológicas não permitem detectar infecções de vírus latente, como infecções pelo herpesvírus durante períodos latentes. Devido a todos estes fatos listados, a hibridização de ácidos nucleicos se torna um método adicional de diagnóstico viral por causa de sua alta sensitividade e seletividade. Atualmente, sondas marcadas com biotina têm sido usadas para exame do fígado através das sequências do DNA do vírus da hepatite. Sondas têm sido usadas para detectar citomegalovírus (CMV) na uri-

Fig. 5 — Esquema de hibridização Southern blot



na, principalmente porque tem se tornado possível o tratamento com drogas antivirais das infecções pelo CMV. Adenovírus em swabs nasais e *micoplasmas pneumoniae* em materiais da nasofaringe são agora identificados rapidamente.

Química clínica

Não é sabido ainda se a detecção de genes codificados para proteínas receptoras é de valor diagnóstico. É aceitável que desarranjos do metabolismo lipídico estão ligados à detecção de genes HDL-receptores. Estes genes podem então ser instrumentos úteis em conectar o desenvolvimento da insuficiência coronariana com metabolismo lipídico.

Medicina legal

As técnicas de hibridização podem ser usadas para testes de paternidade e identificação de indivíduos em estupros ou outros crimes através de pequenos fragmentos de tecidos, esperma, gotas de sangue e até fios de cabelos.

Microbiologia

A detecção de toxinas bacterianas e genes que conferem resistência aos antibióticos freqüentemente requerem muito trabalho e tempo. Uma tentativa para estabelecer um processo seletivo de bactérias resistentes ou tóxicas consiste no isolamento e identificação daqueles genes que são responsáveis para as qualidades patogênicas destas bactérias. Os genes isolados podem então ser usados como sondas em hibridizações, tornando possível uma identificação rápida e real dos microorganismos patogênicos. Até o momento, sondas específicas têm sido empregadas na detecção de cepas enterotóxicas de *E. coli* e identificação de *Neisseria gonorrhoeae* em material humano. Sondas marcadas com biotina já foram usadas para estudar e identificar *Shigella* e *E. coli* enteroinvadiva em fezes de crianças com diarréia.

Genética humana

Cerca de 1.400 doenças hereditárias em humanos são hoje conhecidas. Em alguns casos os genes responsáveis para a doença têm sido localizados sobre o genoma. Através da técnica de hibridização é possível

detectar algumas mutações nestes genes, mesmo pré-natalmente.

Protozoários e helmintos

Alguns autores têm demonstrado a utilidade das sondas de DNA para a detecção direta de agentes parasitas em lesões clínicas, como *Leishmania tropicalis*, mexicana e brasiliensis. Em 1984 foram reportadas sondas para *Plasmodium falciparum*. As sondas de DNA podem também influenciar o diagnóstico de esquistossomose e infecção por *Trypanosoma*.

Sondas para agentes de transmissão sexual

É cada vez maior a lista de organismos classificados como sexualmente transmissíveis, como também é o envolvimento e a importância do laboratório em testar amostras ano-genitais para este amplo grupo de agentes infecciosos. Organismos que provocam doenças sexualmente transmissíveis incluem bactérias, vírus, fungos e protozoários. Apesar da *Neisseria gonorrhoeae* ser reconhecida como um agente de DST há muitos anos, sua replicação e identificação em laboratório ainda é problemática. Mesmo com a ampla variedade de testes disponíveis, alguns desafios como cepas de gonococos suscetíveis aos antimicrobianos usados nos meios seletivos, o fato de não serem reconhecidos pelos reagentes de tipagem baseados em anticorpos ou ainda produzirem resultados equívocos nos testes de utilização de carboidratos podem causar problemas em alguns estudos.

A sonda de DNA para *N. gonorrhoeae* foi primeiramente descrita em 1983 quando o plasmídio criptico do gonococo foi marcado com ^{32}P e usado como sonda em secreções uretrais masculinas que foram passadas em filtros de nitrocelulose. A sensibilidade desta sonda foi de 89% e a especificidade 100%. A sonda foi capaz de detectar pequenas quantidades como 100UFC/ml ou 0,1pg de DNA purificado. Enquanto este estudo mostrou o valor potencial das sondas para detecção direta de gonococos em amostras clínicas, a incapacidade da sonda de reconhecer cepas sem plasmídios era uma séria deficiência.

Redfield e cols., usando sonda

marcada com ^{32}P dirigida contra o HSV, encontraram 78% de sensibilidade e 100% de especificidade. Esta sonda tinha a capacidade de detecção de quatro células infectadas pelo HSV. Sondas pequenas (oligonucleotídeos) têm sido usadas para diferenciar HSV tipo 1 de HSV tipo 2.

Os papilomavírus humanos (HPV), pelo fato de não se replicarem nos sistemas de cultivos celulares convencionais, sempre tiveram seu diagnóstico prejudicado, limitando-se apenas a observações citológicas das alterações que estes vírus provocavam nas células e tecidos. O surgimento da metodologia de hibridização permitiu não apenas a identificação do vírus, mas também um estudo mais detalhado da fisiopatologia deste vírus através de sua tipagem. É cada vez maior o interesse em doenças causadas pelo HPV. Estes vírus estão associados com verrugas genitais e anais (condiloma acuminado) e com lesões pré-malignas, tais como neoplasia intra-epitelial cervical (NIC). As sondas têm permitido uma compreensão maior da história natural destas doenças, sugerindo que a hibridização *in situ* pode ser útil na detecção daquelas mulheres com risco aumentado para o câncer cervical, principalmente onde forem identificados os HPV subtipos 16 e 18 e ainda 31, 33, 35.

Sondas para detecção de *Chlamydia trachomatis* em materiais genitais têm sido reportadas por Hyypia e cols. e Palva e cols. Depois de algumas experiências desanimadoras devido à baixa sensibilidade, Horn e cols. descreveram uma sonda mais promissora usando a hibridização *in situ* em esfregaços cervicais. Usando uma sonda marcada com ^{35}S eles encontraram 91% de sensibilidade e 80% de especificidade quando comparado com culturas celulares. Apesar deste método não ser tão rápido como a coloração com anticorpos monoclonais, sua alta sensibilidade e a capacidade de se usar sondas sobre as mesmas lâminas usadas para os testes citológicos normais têm tornado esta técnica uma opção atrativa.

Catalan e cols. têm trabalhado com sondas para *Mycoplasmas genitalium*, agente que pelo seu crescimento lento muitas vezes não é isolado pelas culturas e períodos de in-

cubação convencionais. As sondas são uma opção rápida para seu diagnóstico.

As sondas para detecção de antígenos HIV podem ser uma boa opção para os demorados e às vezes inconclusivos sistemas de culturas, porém os métodos de hibridização molecular podem ser usados para detectar HIV se o RNA viral está sendo ativamente sintetizado ou se o DNA pró-viral do HIV pode ser enormemente amplificado através do uso de um processo de reação em cadeia de polimerase. Contudo, estes métodos são tecnicamente difíceis e sua sensibilidade e especificidade em um grande número de pacientes não são ainda conhecidos.

Conclusão

Virtualmente todos os microorganismos contêm algumas seqüências de nucleotídeos únicos que podem ser o alvo das sondas de DNA.

As sondas têm sido usadas com sucesso para identificar uma ampla variedade de patógenos. A tecnologia das sondas oferece ao laboratório clínico o potencial para aumentar os tipos de patógenos que podem ser

prontamente identificados pelo laboratório e reduzir significativamente o tempo consumido com a identificação de organismos exigentes. Existem hoje vários *kits* comerciais que incluem ensaios para detectar bactérias, micobactérias e vírus. Sondas para detectar genes de resistências microbianas, fungos e diversos protozoários patógenos têm sido descritas. Sem dúvida, o futuro desta tecnologia é promissor, e nos primeiros passos que já foram dados já se percebeu a importância de tal metodologia.

Referências

- 1. AL-HAKIM HH, HULL R — Studies towards the development of chemically synthesized nonradioactive biotinylated nucleic acid hybridization probes. *Nucleic Acids Res*, 14: 9965-9972, 1986. • 2. BARKER DC, BUTCHER J — The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the Leishmania mexicana and L. braziliensis complexes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 77: 285-297, 1983. • 3. BECKMANN AM, MYERSON D, DALING JR, KIVIAT NB, FENOGLIO CM, MACDOUGALL JK — Detection and localization of Human Papillomavirus DNA in human genital condylomas by *in situ* hybridization with biotinylated probes. *J Med Virol*, 16: 265-273, 1985. • 4. BOILEAU CR, D'HAUTEVILLE HM, SANSONETTI PJ — DNA hybridization technique to detect Shigella species and enteroinvasive Escherichia coli. *J Clin Microbiol*, 20: 959-961, 1984. • 5. CHOU S, MERIGAN TC — Rapid detection and quantitation of human Cytomegalovirus in urine through DNA hybridization. *N Engl J Med*, 308: 921-925, 1983. • 6. COREY L — Laboratory diagnosis of Herpes Simplex Virus infections. Principles guiding the development of rapid diagnostic tests. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 4: 111S-119S, 1986. • 7. ECHEVERRIA PJ, SERIWATANA J, SETHABUTR O, TAYLOR DN — DNA-hybridization in the diagnosis of bacterial diarrhea. *Clin Lab Med*, 5: 447-462, 1985. • 8. FITTS R — Development of a DNA-DNA hybridization test for the presence of *Salmonella* in foods. *Food Technol*, 39: 95-102, 1985. • 9. HIGHFIELD PE, DOUGAN G — DNA probes for microbial diagnosis. *Med Lab Sci*, 42: 352-360, 1985. • 10. HORN JE, QUINN T, HAMMER M, PALMER L, FALKOW S — Use of nucleic acid probes for the detection of sexually transmitted infectious agents. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 4: 101S-109S, 1986. • 11. HYYPPIÄ T, JALAVA A, LARSEN SH, TERHO P, HUKKANEN V — Detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens by nucleic acid spot hybridization. *J Gen Microbiol*, 131: 975-978, 1985. • 12. LOWE JB — Clinical applications of gene probes in human genetic disease, malignancy, and infectious disease. *Clin Chim Acta*, 157: 1-32, 1986. • 13. MASON MM, LASKE BA, RIGGSBY WS — Molecular probe for identification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata*. *J Clin Microbiol*, 25: 563-566, 1987. • 14. TOTTEN PA, HOLMES KK, HANDSFIELD HH, KNAPP JS, PERINE PL, FALKOW S — DNA hybridization technique for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in men with urethritis. *J Infect Dis*, 148: 462-471, 1983. • 15. TENOVER FC — Diagnostic Deoxyribonucleic Acid Probes for Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev*, Jan. 82-101, 1988. • 16. NEUMANN R, LIED-HEGENERO — Nucleic acids as diagnostic tools in medicine. *Labmedica*, 6: 13-18, 1987. • 17. DAN SAULS C, CASKEY TC — Applications of recombinant DNA to pathologic diseases. *Clin Chem*, 31: 804-811, 1985.

8º Congreso Latinoamericano de Enfermedades de Transmisión Sexual

Santiago, Chile, 1991