Antígeno HLA-B27, pesquisa PCR

Comentários
Os antígenos HLA são produtos dos genes do complexo maior de histocompatibilidade. Alguns destes antígenos estão relacionados à presença de determinadas doenças. A associação mais freqüente é a da espondilite anquilosante com o antígeno HLA-B27, que está presente em mais de 90% dos indivíduos de raça branca acometidos por essa doença. A pesquisa também é indicada para identificar risco do acometimento de descendentes. Elevada incidência do antígeno HLA-B27 tem sido relatada na síndrome de Reiter, uveíte anterior, artrite reativa e artrite psoriática. Este antígeno não é um marcador da doença, uma vez que está presente em aproximadamente 10% dos indivíduos normais. O resultado deve ser associado aos achados clínicos e radiológicos sugestivos destas doenças. As vantagens da PCR sobre a citometria de fluxo incluem interpretação objetiva e maior especificidade (a citometria de fluxo pode apresentar reação cruzada com o HLA-B7, HLA-B37 e HLA-B39).
Método
Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.
Valor de referência
Negativo.
Condição
5,0mL de sangue total (ACD/EDTA).
Laboratórios
Colher em tubo estéril. Não colher em heparina.
Conservação para envio
Até 4 dias entre 2º e 8ºC ou em temperatura ambiente. Não congelar.

Chlamydophila pneumoniae, pesquisa PCR

Comentários
A *C. pneumoniae* é causadora de pneumonia atípica. A apresentação mais comum é de um infiltrado intersticial localizado ou difuso. O curso pode ser arrastado, com boa evolução, ou fulminante, evoluindo com insuficiência respiratória. Os testes sorológicos auxiliam a selar o diagnóstico de forma retrospectiva. A cultura apresenta baixa sensibilidade. A PCR é um teste rápido, com sensibilidade de 82,5% e especificidade de 99%.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase do gene 16 sRNA.
Valor de referência
Negativo.
Condição
Swab de orofaringe; escarro; lavado broncoalveolar; aspirado de nasofaringe; líquido pleural ou biópsia de pulmão.
Laboratórios
Swab de orofaringe: colher em kit próprio de PCR ou meio de transporte rosa (Dulbecco's).
Tecidos: conservar em etanol e congelar imediatamente.
Demais materiais: colher em tubo ou frasco estéreis.
Conservação para envio
Líquido pleural e swab: refrigerar até 24 horas.
Tecido: enviar em gelo seco.
Limitações do teste
Reações falso-negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste ou na presença de inibidores da PCR na amostra.

Chlamydia trachomatis, pesquisa PCR

Comentários
As clamídias são bactérias intracelulares obrigatórias, desenvolvendo-se na célula hospedeira e formando inclusões citoplasmáticas. A *C. trachomatis* é responsável por infecções sexualmente transmissíveis (uretrites e cervicites), podendo evoluir, quando não tratadas, para infecções profundas (epididimite, salpingite, peri-hepatite ou esterilidade tubária). É também responsável por conjuntivites e pneumonia no recém-nascido. Pode apresentar-se de forma assintomática em 70% das mulheres e 30% dos homens. A PCR é útil na detecção rápida das infecções em diversos sítios pela *Chlamydia trachomatis*. Tem sensibilidade e especificidade superiores à cultura e imunofluorescência direta. Uma de suas principais vantagens é a possibilidade de ser realizada em amostra de urina. De acordo com o CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças) a PCR é considerada o teste de escolha para este diagnóstico.
Veja também Doenças sexualmente transmissíveis, PCR.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.
Valor de referência
Negativo.
Obs: Este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
20mL de urina do 1º jato (homem/mulher); raspado uretral (homem/mulher); endocervical (mulher); secreção conjuntival; raspado retal; esperma; líquido sinovial.
- Amostras uretrais: não urinar pelo menos 1 hora antes da coleta.
- Urina: não urinar por pelo menos 4 horas antes da coleta.
- Endocervical: a mulher não pode estar menstruada.

Laboratórios
Para amostras de raspado uretral e endocervical é necessário kit especial com swab apropriado e meio de transporte. Para amostra de urina, colher em frasco estéril.
Conservação para envio
- Swab: até 10 dias em temperatura ambiente.
- Urina: até 3 dias entre 2º e 8ºC.

Citomegalovírus, PCR qualitativa

Comentários
O Citomegalovírus (CMV) é um DNA vírus, pertencente à família Herpesviridae. Em adultos saudáveis, o CMV em geral é assintomático, e, às vezes, pode determinar quadro clínico semelhante à mononucleose infecciosa. É encontrado na saliva, urina e outros fluidos corpóreos como o sêmen e secreção vaginal. A importância da infecção pelo CMV é maior quando ocorre a transmissão da gestante para o feto. Manifestações graves podem ocorrer quando o CMV é adquirido ou se reativa em pacientes imunossuprimidos (transplante, AIDS). A PCR é útil nas seguintes situações:
- Meningoencefalite ou outras alterações neurológicas: a PCR pode ser realizada no líquor com sensibilidade que varia de 80% a 92% e especificidade de 98%.
- Diagnóstico pré-natal: quando a gestante apresenta um quadro de infecção aguda e pretende-se afastar a possibilidade de infecção intra-uterina por meio da PCR no líquido amniótico.
- Infecção do recém-nascido: a detecção do CMV na urina ou sangue de RN nas três primeiras semanas de vida define a infecção congênita. A sensibilidade e especificidade são de 98% e 100%, respectivamente.
- Infecção localizada em órgão-alvo: a PCR pode ser realizada em líquidos corporais ou material de biópsia de lesões ou órgãos suspeitos.

Método
Reação em Cadeia da Polimerase Aninhada (Nested PCR) do gene IE do CMV.
Valor de referência
Negativo.
Condição
20mL de urina; 5,0mL de sangue total (EDTA); 1,0mL de líquor; 1,0mL de líquido amniótico; 250mg de material de biópsia; 3,0mL de lavado brônquico/alveolar ou outros fluidos orgânicos.

(continua)

Laboratórios
Colher em frasco estéril
Conservação para envio
- Líquor e líquido amniótico: refrigerar *overnight.*
- Lavado brônquico/alveolar: refrigerar.
- Sangue total: enviar em temperatura ambiente.
- Tecido: conservar em etanol, congelar imediatamente e enviar em gelo seco. Não enviar em formol.
- Urina: até 7 dias entre 2º e 8º C. Não congelar.
Limitações do teste
- Por ser um método qualitativo não distingue infecção aguda da reativação de uma forma latente.
- A presença de pequenas quantidades de DNA do CMV no sangue periférico (após o período neonatal) não está associada à presença de doença. Para essa finalidade recomenda-se método quantitativo, como por exemplo, a antigenemia p65.
- Reações falso-negativas ocorrem quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste ou na presença de inibidores da PCR na amostra.

Dengue, PCR qualitativa e Tipagem

Comentários
O Dengue é uma doença infecciosa aguda causada por um flavivírus transmitido através da picada do mosquito vetor *Aedes aegypti*. Após a transmissão, existe um período de incubação de dois a sete dias. Existem quatro sorotipos causadores de dengue, que não oferecem proteção cruzada entre si (den1, den2, den3 e den4). Os principais sintomas da doença são febre, calafrios, mialgia e cefaléia. As crianças apresentam formas mais leves da doença, sendo assintomáticas em 80% dos casos. Em determinadas situações, a evolução pode dirigir-se para a forma hemorrágica, que raramente ocorre na infecção primária. É mais comum na reinfecção, geralmente quando o agente é o den2 ou den3. A confirmação do diagnóstico de dengue pode ser realizada através de exames sorológicos (ELISA) ou da PCR (polymerase chain reaction). Como a sorologia (anticorpos circulantes IgM) começa a ser reativa do quarto ao oitavo dia de doença, a PCR é útil durante o período de viremia, em geral, antes de surgirem os sintomas até o sétimo dia da infecção. É possível realizar a genotipagem e definir o sorotipo do vírus da dengue, através da utilização de iniciadores (*primers*) específicos.
Método
Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase
Tipagem (identificação dos tipos 1, 2, 3 e 4 através da PCR com "primers" específicos)
Condição
1,0mL de soro ou plasma (EDTA).
Laboratórios
Este exame depende da antigenemia do vírus, é qualitativo e deve ser pedido na fase aguda da viremia, de preferência nos primeiros 5 dias de evolução. Coleta em frasco estéril.
Conservação para envio
Até 72 horas congelado (enviar em gelo seco).
Limitações do teste
Reações falso-negativas ocorrem quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste, após 10 dias do início dos sintomas ou na presença de inibidores da PCR na amostra.

Doenças sexualmente transmissíveis, PCR multiplex

C. trachomatis - N. gonorrhoeae - U. urealyticum - M. genitalium - M. hominis

Comentários

A PCR multiplex é capaz de detectar, em uma única reação, a maioria das bactérias associadas às infecções do trato genital: *C. trachomatis, N. gonorrhoeae, M. hominis, M. genitalium* e *U. urealyticum*. É de grande valia no diagnóstico diferencial das uretrites e cervicites. As Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) estão entre as cinco principais causas de procura por serviços de saúde e quando não tratadas podem levar a doenças inflamatórias da pelve, infertilidade e gravidez ectópica. A PCR multiplex pode ser realizada em urina de primeiro jato, sendo técnica mais rápida e sensível que os métodos convencionais.

Método

Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex – Multiplex PCR.

Valor de referência

Negativo.

Condição

30mL de urina do 1º jato da manhã; secreção uretral ou secreção endocervical.

- Amostras uretrais: não urinar pelo menos 1 hora antes da coleta.
- Urina: não urinar por pelo menos 4 horas antes da coleta.
- Endocervical: a mulher não pode estar menstruada.

Laboratórios

Para amostras de raspado uretral e endocervical é necessário kit especial com swab e meio de transporte. Apropriados. Para amostra de urina, colher em frasco estéril.

Conservação para envio

Swab: até 10 dias em temperatura ambiente

Urina: até 3 dias da coleta entre 2º e 8ºC.

Epstein-Barr, PCR qualitativo

Comentários

A infecção pelo Vírus Epstein-Barr (EBV) é extremamente comum. Nos adolescentes e adultos jovens, a infecção primária é caracterizada pelo quadro de mononucleose infecciosa. O EBV pertence à família Herpesviridae, infectando células epiteliais da nasofaringe e linfócitos B que espalham o vírus pelo organismo. Cerca de 90% dos infectados evoluem para infecção crônica e complicações podem estar associadas ao EBV nestes casos: leucoplasia pilosa, carcinoma de nasofaringe, desordens mieloproliferativas, linfomas pós-transplantes, linfomas do sistema nervoso central, linfomas de células T e doença de Hodgkin. A PCR é um dos métodos mais sensíveis para a detecção do genoma viral. A PCR no soro ou plasma, em conjunto com o painel de sorologia, é útil como teste confirmatório da infecção, uma vez que parte dos pacientes não apresenta anticorpos heterofílicos e a IgM VCM tem caráter transitório. Na Doença Linfoproliferativa Pós-Transplante (PTLD), onde encontramos tumores relacionados ao EBV, o DNA do EBV pode ser detectado no soro 7 a 50 dias antes do aparecimento dos tumores. Em pacientes HIV positivos com linfadenopatia generalizada persistente, a presença de DNA do EBV sérico apresenta risco aumentado de desenvolvimento do linfoma. A detecção do EBV DNA no líquor é uma abordagem prática e alternativa à sorologia ou à cultura para pacientes com complicações no SNC, que ocorrem em 1% dos casos, podendo ser a única manifestação clínica da infecção pelo EBV. No líquor, a PCR positiva em pacientes com AIDS e lesões focais cerebrais é um forte indicador de linfoma cerebral. O DNA do EBV pode ser encontrado em tecidos de diversos tumores malígnos e benígnos, incluindo linfomas, carcinoma nasofaríngeo e carcinoma gástrico.

Método

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) aninhada ("*Nested* PCR")

Valor de referência

Negativo

Condição

1,0mL de líquor; 1,0mL de plasma (EDTA) ou 250mg de material de biópsia.

Laboratórios

Colher em frasco estéril.

Conservação para envio

Líquor: refrigerar *overnight*.

Tecido: conservar em etanol, congelar imediatamente e enviar em gelo seco. Não enviar em formol.

Plasma: até 3 dias congelado.

Gene CCR-5, pesquisa da deleção

Comentários
A base molecular do tropismo do HIV-1 parece estar na habilidade do envelope das cepas interagirem com diferentes co-receptores. As cepas primárias do HIV-1 com tropismo por macrófagos são não indutoras de sincício, e utilizam um co-receptor, o CCR5. Indivíduos com deleção de 32 nucleotídeos hereditária homozigota no gene CCR5 apresentam resistência á infecção pelo HIV-1. A PCR para a região do gene CCR5 tem objetivo de detectar presença ou não da deleção do gene CCR5
Método
Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.
Valor de referência
Ausência de deleção no gene CCR-5.
Condição
5,0mL de sangue total (EDTA).
Laboratórios
Enviar em frasco estéril.
Conservação para envio
Até 72 horas em temperatura ambiente ou refrigerada entre 2º e 8º C.

Hepatite B, PCR qualitativa

Comentários
A hepatite B é causada por um vírus envelopado de DNA circular, da família Hepadnaviridae. Cerca de 10% das infecções pelo HBV tornam-se crônicas, variando o quadro clínico desde o estado de portador assintomático à hepatite crônica ativa, que pode evoluir para a cirrose hepática e câncer hepatocelular. A pesquisa de DNA do HBV no soro é o marcador mais sensível na avaliação de infectividade e replicação viral em pacientes portadores crônicos. Poderá ser utilizada nos casos de positividade isolada do Anti-HBc (HBsAg e Anti-HBs negativos) indicando a presença de infecção "oculta" em caso de positividade. Outra aplicação seria a detecção de mutantes do envelope, em região conhecida como determinante "a" (pacientes com infecção ativa pelo vírus B e HBsAg negativos). Para monitorização de tratamento anti-viral é recomendado o uso da PCR quantitativa.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.
Valor de referência
Negativo.
Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Nota
A presença de um resultado negativo não descarta a possibilidade de inibidores na amostra ou viremia abaixo do limite de detecção do teste (sensibilidade: 200 cópias/mL de soro).
Condição
1,0mL de soro.
Laboratórios
O sangue deve ser colhido em tubo de vacutainer ou seringa estéril. Centrifugar a 1.800r.p.m., por 10 minutos. Aliquotar assepticamente 1,0mL de soro em frasco estéril. Congelar imediatamente e enviar no gelo.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado.

HBV, PCR Quantitativo em Tempo Real

Comentários
Útil para avaliação do prognóstico e acompanhamento da resposta terapêutica dos pacientes portadores crônicos do HBV.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR *Real Time*).
Valor de referência
Não detectável.
O valor mínimo quantificável é de 6 UI/mL de DNA do HBV.
Este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivos e falso-negativos, que é uma característica do método.
Condição
1,5mL de soro ou plasma (EDTA/ACD).
Enviar em kit próprio para PCR. Não enviar em tubo tipo Eppendorf.
Laboratórios
Solicitar kit próprio para transportar amostras de exames de PCR.
Coleta
O sangue deve ser colhido em tubo vacutainer ou seringa estéril. Centrifugar a 1800 r.p.m., por 10 minutos. Aliquotar assepticamente 1,0mL de soro em frasco estéril. Congelar imediatamente e enviar no gelo.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado.

Hepatite B, teste de resistência aos antivirais

Comentários
Indicado para avaliação do paciente que não está respondendo ao tratamento com a lamivudina, ajudando a guiar possíveis decisões terapêuticas contra o HBV. O surgimento de mutações no gene da DNA polimerase do HBV levam à resistência a estes anti-virais, permitindo o reaparecimento do DNA do vírus no soro, principalmente em indivíduos submetidos a uma terapia prolongada. As mutações associadas à resistência ao tratamento anti-viral são:

- Mutação L528M: a substituição do aminoácido leucina (L) pela metionina (M) na posição 528 na proteína da DNA polimerase leva a redução de 18 vezes da sensibilidade à lamivudina.
- Mutação na região YMDD da DNA polimerase (posição 552):
  - Mutação M552V: a substituição da metionina (M) pela valina (V) na posição 552, leva a uma redução de 150 a 300 vezes da sensibilidade à lamivudina.
  - Mutação M552I: a substituição da metionina (M) pela isoleucina (I) na posição 552 está relacionada com uma resistência à lamivudina bastante acentuada, com redução de cerca de 10.000 vezes da sensibilidade.

Método
Amplificação do gene da DNA polimerase do HBV utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise com enzima de restrição (RFLP). É um teste rápido e sensível, capaz de estabelecer precocemente o diagnóstico de resistência genética às drogas.
Condição
2,0mL de soro.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado
Laboratórios
Colher em tubo estéril ou próprio para PCR.
Limitações do teste
É necessária uma carga viral suficiente para a realização do teste (≥ 1.000 cópias/mL) nos últimos 60 dias.

Hepatite C, genotipagem

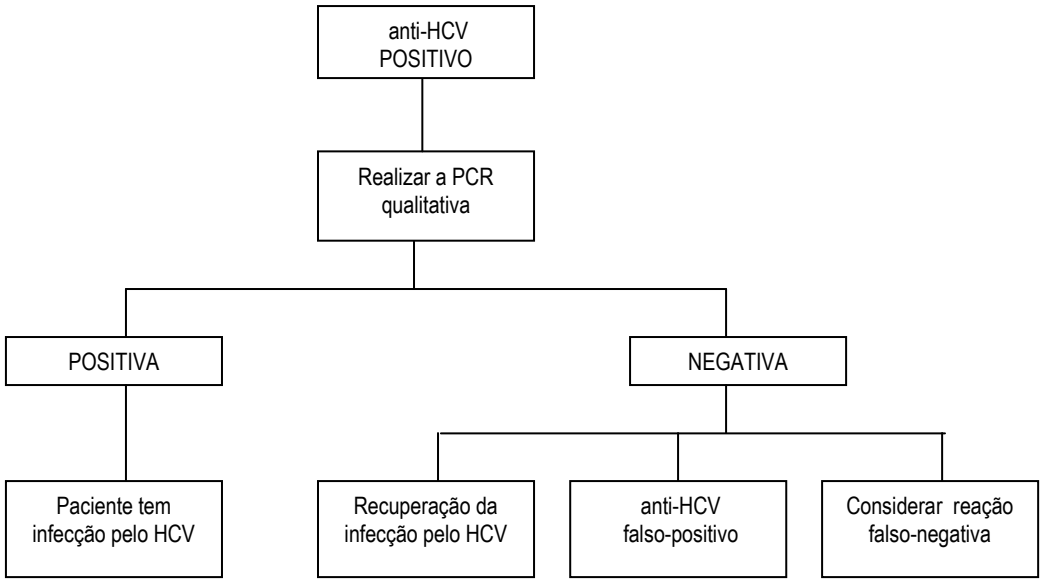
Comentários
O vírus da hepatite C (HCV) apresenta alta variabilidade genética, o que leva a uma grande heterogeneidade em suas seqüências de nucleotídeos. Baseado em estudos de seqüenciamento genético, o HCV foi classificado em seis genótipos maiores e vários subtipos designados como: 1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3a, 3b, 4, 5 e 6. Portadores do vírus do genótipo 1, principalmente o 1b, apresentam doença mais grave e pior resposta ao tratamento com interferon. Sendo assim, a genotipagem do HCV auxilia no prognóstico e conduta terapêutica do paciente com infecção crônica. É necessária uma carga viral superior a 1.000UI/mL para que esse exame possa ser realizado. Amostras com quantidades inferiores à sensibilidade do teste podem não apresentar partículas virais suficientes para a amplificação e análise do gene do HCV e o resultado será liberado como inconclusivo.
Método
Transcrição Reversa, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e análise dos fragmentos após digestão com enzimas de restrição (RFLP).
Condição
2,0mL de soro ou plasma (EDTA, ACD).
Laboratórios
O sangue venoso deve ser colhido em tubo PPT-vacutainer ou seringa estéril. Deixar coagular em temperatura ambiente durante 20 minutos e centrifugar a 1.800r.p.m., por 10 minutos. Aliquotar 2,0mL de soro assepticamente, em frasco estéril. Congelar imediatamente. Enviar em gelo seco o mais rápido possível, juntamente com um resultado quantitativo por uma das técnicas de amplificação de ácido nucleico ou um PCR qualitativo.
Nota
A quantificação viral deverá ser pedida em conjunto, caso o cliente ainda não tenha feito nenhum estudo prévio por método de biologia molecular. A genotipagem será feita na dependência do resultado da quantificação.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado.

Hepatite C, PCR qualitativa

Comentários
O HCV é o principal agente das hepatites não-A não-B. É um vírus RNA pertencente à família Flaviviridae. A infecção aguda é freqüentemente inaparente e cronifica-se em cerca de 50% a 60% dos casos, podendo evoluir para hepatite crônica. Eventualmente, pode progredir para a cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. A realização do PCR qualitativo é indicada para:
- Confirmar a presença da infecção ativa (com replicação viral) pelo HCV, após um resultado sorológico indeterminado ou positivo (pesquisa de anticorpo anti-HCV), conforme o algoritmo abaixo.
- Fazer o diagnóstico da infecção pelo HCV em pacientes imunodeprimidos (HIV, transplante) que podem permanecer soronegativos.
- Detectar a presença do vírus precocemente, a partir da 1ª a 2ª semana após a exposição.
- A sensibilidade do PCR HCV qualitativo é de 50 UI/mL

Método
Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.
Valor de referência
Negativo.
Obs.: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
1,0mL de soro ou plasma (EDTA/ACD).
Laboratórios
Enviar no gelo o mais rápido possível. O sangue deve ser colhido em tubo vacutainer (PPT ou convencional) ou seringa estéril com EDTA. No caso de soro, deixar coagular em temperatura ambiente durante 20 minutos e centrifugar a 1.800r.p.m., por 10 minutos. Aliquotar 1,0mL de soro ou plasma assepticamente, em frasco estéril. Congelar imediatamente. Enviar em gelo seco.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado.

(congelado)



Hepatite C, bDNA (quantitativo)

Comentários
Exame útil para determinar a carga viral para avaliação da resposta terapêutica e acompanhamento do paciente infectado pelo HCV. Valores iguais ou superiores a 800.000UI/mL (carga viral alta) são considerados como preditores de pior prognóstico. O valor mínimo quantificável é de 615UI/mL.
Método
Técnica de DNA ramificado – Amplificação do sinal.
Valor de referência
Não detectável.
Obs.: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
1,0mL de soro ou plasma (EDTA/ACD).
Laboratórios
O sangue deve ser colhido em tubo vacutainer (PPT ou convencional) ou seringa estéril com EDTA. No caso de soro, deixar coagular em temperatura ambiente durante 20 minutos e centrifugar a 1.800r.p.m., por 20 minutos. Aliquotar assepticamente 1,0mL de soro ou plasma, em frasco estéril. Congelar imediatamente e enviar em gelo seco. Enviar em frasco estéril ou solicitar KIT.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado.

Hepatite C, PCR quantitativa

Comentários
Exame também útil para determinar a carga viral para avaliação da resposta terapêutica e acompanhamento do paciente infectado pelo HCV. Valores iguais ou superiores a 800.000UI/mL (carga viral alta) são considerados como preditores de pior prognóstico. O valor mínimo quantificável é de 600 UI/mL.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
Valor de referência
Não detectável.
Obs.: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
1,0mL de soro ou plasma (EDTA/ACD).
Laboratórios
Enviar no gelo o mais rápido possível. O sangue deve ser colhido em tubo vacutainer (PPT ou convencional) ou seringa estéril com EDTA. No caso de soro, deixar coagular em temperatura ambiente durante 20 minutos e centrifugar a 1.800r.p.m., por 10 minutos. Aliquotar 1,0mL de soro ou plasma assepticamente, em frasco estéril. Congelar imediatamente. Enviar em gelo seco.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado.

Herpesvírus Simples 1 e 2, PCR e genotipagem

Comentários
Os Vírus Herpes Simples (HSV) do tipo 1 e 2 estão relacionados a uma grande variedade de manifestações clínicas, variando desde uma estomatite leve até doença fatal. A encefalite e o herpes neonatal são fatais em 70% dos casos, com seqüelas neurológicas na maioria dos sobreviventes. As lesões mucocutâneas podem ser graves e de evolução prolongada no paciente imunocomprometido. Como o tratamento anti-viral pode alterar o curso da infecção pelo HSV, o diagnóstico precoce é de extrema importância. Na encefalite herpética a PCR apresenta sensibilidade de 98% e a especificidade de 99%, sendo, atualmente, o método "padrão-ouro" recomendado para o seu diagnóstico. A PCR também é útil na suspeita de herpes neonatal (líquor, aspirado nasofaríngeo) e na presença de lesões cutâneas de etiologia indefinida ou duração prolongada.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase Aninhada - Nested PCR. Tipagem (discriminação entre o HSV do tipo 1 e o do tipo 2 através da utilização de "primers" específicos para cada vírus).
Valor de referência
Negativo.
Condição
1,0mL de líquor; 5,0mL de sangue total (EDTA); 1,0mL de líquido amniótico; raspado da lesão (colher em kit *Digene*); 250mg de material de biópsia no kit *Digene* ou imerso em etanol a 70%.
Laboratórios
Colher em frasco estéril.
Condições de envio
Líquor e líquido amniótico: refrigerar *overnight.*
Sangue total: enviar em temperatura ambiente, até 72 horas, ou refrigerado entre 2 e 8°C.
Tecidos: congelar imediatamente e enviar em gelo seco. Não enviar em formol.
Limitações do teste
Reações falso-negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste ou na presença de inibidores da PCR na amostra.

HIV, bDNA (quantitativo)

Comentários
A versão 3.0 do bDNA apresenta boa correlação (97,6%) com a PCR e o NASBA. Apresenta alta sensibilidade, sendo o valor mínimo quantificado de 50 cópias de RNA do HIV-1 por mililitro. É capaz de detectar com a mesma precisão todos os subtipos do HIV-1. É a técnica utilizada pela Rede Pública no Brasil.
Método
DNA ramificado ou *branched DNA* (bDNA).
Valor de referência
Negativo.
Condição
3,0mL de plasma (EDTA/ACD).
Laboratórios
O sangue deve ser colhido em tubo *Vacutainer* (PPT ou convencional) ou seringa estéril com EDTA. Centrifugar a 1.800r.p.m., por 20 minutos, no máximo de 4 horas após a coleta. Aliquotar assepticamente 5,0mL de plasma em frasco estéril. Congelar imediatamente e enviar no gelo seco. Enviar em frasco estéril ou solicitar o kit fornecido pelo laboratório.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado

HIV, PCR qualitativa (diagnóstico)

Comentários
O HIV-1 é um vírus RNA, que infecta células que apresentam a molécula CD4 expressa na sua superfície (linfócitos T helper e monócitos). A infecção apresenta aspecto crônico e progressivo sendo caracterizada por severa imunodeficiência associada a infecções oportunistas, desenvolvimento de tumores, especialmente sarcoma de Kaposi, e envolvimento do sistema nervoso, que caracterizam a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA). A PCR qualitativa do HIV-1 é útil para:
- Detectar o HIV-1 antes da soroconversão (período de janela imunológica, que tem duração, em geral, de 3 a 8 semanas após o contato inicial);
- Esclarecer um Western blot indeterminado e avaliar a presença desta infecção em crianças nascidas de mães sabidamente infectadas pelo HIV-1.

Método
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) aninhada ("*Nested* PCR").
Valor de referência
Negativo.
Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Nota
A presença de um resultado negativo não descarta a possibilidade de inibidores na amostra ou viremia abaixo do limite de detecção do teste (sensibilidade: 10 cópias/mL de plasma).
Condição
5,0mL de sangue total (EDTA).
Laboratórios
Enviar as amostras em temperatura ambiente. As amostras devem ser processadas até, no máximo, 72 horas após a coleta. Enviar em frascos estéreis.
Conservação para envio
Até 72 horas entre 2º e 8ºC. Não congelar.

HIV, PCR quantitativa

Comentários
A quantificação da carga viral pode ser utilizada com o objetivo de:
▪ Estabelecer o prognóstico de um indivíduo (tempo de progressão para AIDS). Sabe-se que quanto maior o nível do RNA do HIV, maior é a destruição de células CD4.

Tabela 1: Relação entre a carga viral e progressão para AIDS.

Carga viral (cópias de RNA/mL de plasma)	AIDS após 5 anos de infecção	Tempo médio (em anos) de desenvolvimento da AIDS
> 36.000	62%	3,5
13.000 – 36.000	49%	5,5
4.000 –13.000	26%	7,7
< 4.000	8%	> 10

▪ Determinar o início do tratamento anti-retroviral.
▪ Avaliar a eficácia das drogas anti-retrovirais. Uma mudança de tratamento deverá ser considerada se:
- Não há queda de pelo menos 0,5 a 0,75log na carga viral, após um mês de tratamento.
- Não há queda para níveis indetectáveis (menor que 50 cópias/mL) em 4 a 6 meses.
- Aumento da carga viral após manter níveis indetectáveis, sugerindo resistência aos anti-retrovirais.
- Queda contínua do número de linfócitos CD4 (>25%).
- Deterioração clínica.

Obs: 1. Oscilações entre dois resultados de exame de carga viral menores do que $0{,}5\log_{10}$ (aproximadamente 3 vezes) não são consideradas significativas do ponto de vista clínico.
2. Vários fatores podem influenciar a variação do RNA do HIV no plasma. As mais comuns decorrem de ativação do sistema imune (infecções intercorrentes ou imunizações).

Método
Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase RT-PCR

Valor de referência
Negativo. O valor mínimo quantificável é de 400 cópias de RNA viral/mL de plasma – para um menor valor de detecção, solicitar o método ultrassensível, que detecta a partir de 50 cópias de RNA viral/mL.
Nota: devido a variações individuais e metodologias do teste, apenas variações maiores que 0,5 log no número de cópias de RNA viral/mL devem ser consideradas para decisões terapêuticas.
Este exame pode apresentar resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.

Condição
1,0mL de plasma (EDTA).

Laboratórios
O sangue deve ser colhido em tubo *Vacutainer* (PPT ou convencional) ou seringa estéril com EDTA. Centrifugar a 1.800r.p.m., por 20 minutos. Aliquotar assepticamente 1,0mL de plasma em frasco estéril. Congelar imediatamente e enviar no gelo seco. Enviar em frasco estéril ou solicitar kit.

Conservação para envio
Até 5 dias congelado.

HIV, PCR quantitativa ultra-sensível

Comentários
A realização deste exame está indicada para acompanhar a resposta terapêutica após HIV-PCR quantitativo negativo ou quando a carga viral atingir valores abaixo de 75.000 cópias/mL. Apresenta sensibilidade de 50 cópias de RNA do vírus/mL de plasma. Pacientes com carga viral menor que 50 cópias/mL têm um prognóstico melhor do que aqueles com valores entre 50 e 400 cópias/mL.

Método
Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.

Valor de referência
Negativo.
Obs: a faixa de detecção do PCR HIV-1 quantitativo ultra-sensível varia de 50 a 75.000 cópias do RNA/mL.

Condição
1,5mL de plasma (EDTA/ACD).

(continuar)

Laboratórios
O sangue deve ser colhido em tubo *Vacutainer* (PPT ou convencional) ou seringa estéril. Centrifugar a 1.800r.p.m., por 20 minutos. Aliquotar assepticamente 1,5mL de plasma em frasco estéril. Congelar imediatamente e enviar no gelo seco.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado.

HIV, resistência genotípica aos antivirais

Comentários
Detecta a presença de mutações no gene pol do HIV-1, que levam à resistência às drogas utilizadas no tratamento da infecção crônica, como os inibidores nucleosídeos e não nucleosídeos da transcriptase reversa, e aos inibidores da protease. Este teste está indicado para: determinar a droga anti-retroviral de escolha quando o paciente apresenta falência ao tratamento atual; avaliar o padrão do vírus infectante na fase aguda da infecção pelo HIV; avaliar o padrão de resistência na mulher grávida. Devido ao acúmulo de dados relacionados à interpretação dos testes de resistência aos anti-retrovirais, será realizada uma atualização semestral da tabela de mutações relacionadas à resistência. Estamos utilizando o sistema de pontuação das mutações (*mutation score*) do Hospital Universitário de Stanford**.** O peso de cada mutação foi determinado através de estudos publicados que correlacionavam tratamento e genótipo, genótipo e fenótipo e finalmente, genótipo e evolução clínica. O laudo de interpretação do resultado apresentará 3 níveis de resistência às drogas:
1- Sensível (0 a 14): o vírus seqüenciado não apresenta redução de susceptibilidade às drogas.
2- Resistência parcial (15 a 59): a inibição do crescimento "in vitro" não é total. Valores entre 15 e 29 indicam um baixo grau de resistência e, apesar destes vírus apresentarem redução da sensibilidade às drogas "in vitro", alguns pacientes portadores destas cepas mostram resposta virológica sub-ótima ao tratamento.
3- Resistente (60 ou superior): estes vírus apresentam alto grau de resistência "in vitro" ou não apresentaram resposta virológica durante tratamento com os anti-retrovirais.
Método
Transcrição reversa do RNA do HIV-1, seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene pol e seqüenciamento genético do DNA.
Valor de referência
Não foi detectada a presença de resistência.
Condição
2,0mL de plasma (EDTA/ACD).
Enviar juntamente com a requisição de genotipagem, um resultado de carga viral ≥ 1000 cópias de RNA viral/mL com menos de 30 dias.
Nota
A quantificação viral poderá ser pedida em conjunto, caso o cliente não tenha um resultado recente. A genotipagem será feita na dependência do valor encontrado.
Laboratórios
O sangue deve ser colhido em tubo *Vacutainer* (PPT ou convencional) ou seringa estéril com EDTA. Centrifugar a 1.800 r.p.m., por 20 minutos. Separar em frasco estéril e congelar no máximo 4 horas após coleta. Anotar data da coleta e hora do congelamento nos frascos e na requisição. Enviar em gelo seco.
Conservação para envio
Até 5 dias congelado.
Limitações do teste
É necessária uma carga viral suficiente para a realização do teste (≥ 1.000 cópias/mL). Tanto os testes genotípicos quanto os fenotípicos são pouco sensíveis a variantes minoritárias, presentes em um percentual abaixo de 20% do total da população viral. Como os métodos analisam os vírus que estão se replicando ativamente no momento da amostragem, não são detectados vírus resistentes às drogas as quais o paciente foi exposto no passado. A descontinuação da terapia leva à proliferação do tipo selvagem que pode enganosamente sugerir susceptibilidade.

HPV – Baixo e alto risco

Comentários

Útil no diagnóstico e acompanhamento da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Identifica 18 tipos do HPV divididos em sondas de baixo e alto risco para neoplasia cervical. Permite a detecção de 1 pg/mL de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus por célula. O resultado é considerado positivo quando as relações RLU/PCA para os vírus do grupo A (6, 11, 42, 43 e 44) e/ou RLU/PCB para os vírus do grupo B (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) forem iguais ou maiores que 1. A Captura Híbrida contém sondas gênicas de 70% dos tipos de HPV de baixo risco e 99% dos oncogênicos. Valores das relações RLU/PCA e/ou RLU/PCB menores que 50, indicando pequeno número de cópias virais por célula, podem significar infecção inicial ou fase de remissão espontânea. Nesses casos, a critério clínico, sugere-se, antes de qualquer tratamento, confirmar a presença de infecção ativa com nova coleta após intervalo de três meses. Para aferição da eficácia do tratamento, indica-se colher nova amostra após três meses do término da terapêutica.

HPV – Alto risco

Comentários

A Captura Híbrida para vírus do grupo B (alto risco) poderá ser feita de forma isolada. Útil no diagnóstico e acompanhamento da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Identifica os 13 tipos do HPV de maior risco para câncer cervical. Permite a detecção de1 pg/mL de DNA-HPV, equivalente a 0,1 cópia de vírus por célula. O resultado é considerado positivo quando a relação RLU/PCB para os vírus do grupo B (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) forem iguais ou maiores que 1. A Captura Híbrida contém sondas gênicas de 99% dos HPV com maior potencial de oncogenicidade. Valores da relação RLU/PCB menor que 50, indicando pequeno número de cópias virais por célula, pode significar infecção inicial ou fase de remissão espontânea. Nesses casos, a critério clínico, sugere-se, antes de qualquer tratamento, confirmar a presença de infecção ativa com nova coleta após intervalo de três meses. Para aferição da eficácia do tratamento, indica-se colher nova amostra após três meses do término da terapêutica.

Método

Técnica da hibridização molecular associada a anticorpos monoclonais.

Condição

Raspado ou secreção de lesões ou região suspeita (colo uterino, vagina, vulva, região perineal, perianal, anal, pênis, glande, prepúcio, bolsa escrotal, cavidade oral); biópsia (colo uterino, vulva, pênis, anus, etc).

Coleta

O paciente poderá ser encaminhado para colher o material no próprio laboratório. Para isso, é necessária a solicitação médica de Captura Híbrida com a descrição do local anatômico de onde deve ser colhida a amostra. Para os casos de coleta cérvico-vaginal, solicita-se abstinência sexual de 3 dias e a paciente não deve estar menstruada. Não estar em uso de creme ou óvulo vaginal e não fazer ducha interna no dia do exame. Se houver necessidade da coleta de citologia na mesma consulta, esta deve ser realizada em primeiro lugar. No caso de aplicação de ácido acético ou iodo, colposcopia ou ultra-som transvaginal, aguardar 3 dias para a realização do exame. Para coleta uretral, estar há pelo menos 4 horas sem urinar e para coleta peniana, um mínimo de 8 horas sem higiene local.

Laboratórios e médicos

Solicitar kit especial para coleta do material.

Instruções

Não é recomendável efetuar exame digital (toque), colposcopia ou assepsia prévia; evitar contaminar a escova; a presença de sangue (não menstrual) ou conteúdo vaginal supostamente infectado não traz qualquer alteração no resultado; efetuar a coleta com leve atrito da escova na região que se quer estudar (colo uterino, vagina, vulva, região perineal e perianal, pênis, ou cavidade oral), preferentemente nas áreas consideradas suspeitas. Na coleta de material da pele, essa deve ser umedecida com soro fisiológico, raspada com lâmina de bisturi e a amostra deverá ser colocada dentro do tubete com o uso da escova; inserir a escova no tubete imediatamente após a coleta do material; quebrar a haste, fechar o tubete fixando-o na caixa de transporte. Preencher corretamente a ficha de solicitação e colocá-la no interior da caixa.

Conservação para envio

Escovados (raspados): até 2 semanas em temperatura ambiente.

Biópsias de colo uterino: colocar imediatamente dentro do kit coletor entre 2º e 8ºC por, no máximo, uma noite; após este período, armazenar entre - 5 e - 25ºC por, no máximo, 30 dias.

Comentários

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus sexualmente transmissível e provoca o aparecimento de verrugas nos órgãos genitais e na região anal (condiloma acuminado) ou pode se apresentar de forma subclínica. Há forte evidência de que o HPV desempenha um papel na carcinogênese da genitália externa, das neoplasias intraepiteliais vulvares, dos carcinomas escamosos de vagina e dos carcinomas do colo de útero. Em mais de 90% dos casos de câncer cervical, existe a presença de DNA do HPV. Existem mais de 70 genótipos do HPV, e já foram identificados mais de 30 tipos infectando a genitália humana. Os tipos de HPV associadas à infecção genital são divididos em categorias de alto e baixo risco, conforme seu potencial oncogênico (ver tabela). Esta técnica apresenta alta sensibilidade para detecção da infecção pelo HPV e é capaz de definir exatamente o tipo do HPV relacionado às lesões clínicas. Identifica também a presença de infecções mistas (por mais de um tipo diferente).

RISCO	Tipo do HPV	
	Associação freqüente	**Associação menos freqüente**
Alto risco	16, 18	26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 e 82.
Baixo risco	6, 11	40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108.

Método

Reação em Cadeia da Polimerase e Polimorfismo de Fragmentos por Enzima de Restrição (RFLP).

Condição

Raspado ou secreção de lesões ou região suspeita (colo uterino, vagina, vulva, região perineal, perianal, anal, pênis, glande, prepúcio, bolsa escrotal, cavidade oral); biópsia (colo uterino, vulva, pênis, anus, etc); bloco de parafina.

- Cuidados:

- Não é recomendável efetuar exame digital (toque), colposcopia ou assepsia prévia. É recomendável fazer abstinência sexual 3 dias antes da coleta. Se houver necessidade da coleta de citologia na mesma consulta, esta deve ser realizada em primeiro lugar. Amostra de swab cervical deve ser coletada antes da aplicação do ácido acético e iodo, no exame colposcópico. Evitar contaminar a escova de coleta. Não realizar a coleta durante o período menstrual.

- Coleta:

- Solicitar kit especial para coleta do material.
- Efetuar a coleta com leve atrito da escova na região que se quer estudar, preferencialmente, nas áreas consideradas suspeitas. Na coleta de material da pele, essa deve ser umedecida com soro fisiológico, raspada com lâmina de bisturi e a amostra deverá ser colocada dentro de tubetes com uso da escova de coleta.
- Inserir a escova de coleta no tubete imediatamente após a coleta do material, quebrar a haste e fechar o tubete fixando-o na caixa de transporte.
- O material deverá ser enviado o mais rápido possível.

Conservação para envio

Escovados (raspados): até 2 semanas em temperatura ambiente.

Biópsias de colo uterino: colocar imediatamente dentro do kit coletor entre 2º e 8ºC por, no máximo, uma noite; após este período, armazenar entre - 5 e - 25ºC pó, no máximo, 30 dias.

HTLV-I, PCR

Comentários
O HTLV-I é um retrovírus associado com a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA), com uma desordem neurológica denominada "paraparesia espástica tropical" e com a mielopatia associada ao HTLV-I (MAH). Sua transmissão ocorre através de transfusão de sangue, contato sexual e seringas contaminadas (usuários de drogas). A transmissão perinatal ainda não foi comprovada. A presença de anticorpos anti-HTLV-I, detectados através do ELISA, é encontrada em alta freqüência em pessoas apresentando as desordens mencionadas acima. Todo ELISA positivo deverá ser confirmado através da técnica Western blot ou do PCR. O PCR está indicado, também, para pacientes com sorologia inconclusiva ou com Western blot indeterminado para HTLV-I.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.
Valor de referência
Negativo.
Este exame pode apresentar, embora raramente, resultado falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
5,0mL de sangue total (EDTA).
Laboratórios
Enviar em frasco estéril.
Conservação para envio
Até 72 horas entre 2º e 8ºC. Não congelar.

Legionella sp., PCR

Comentários
Dentre os agentes etiológicos associados a um quadro de pneumonia comunitária, cita-se a *Legionella pneumophila.* A infecção causada por *L. pneumophila* tem maior freqüência nos pacientes com DPOC, alcoólatras, usuários crônicos de corticosteróides e imunodeprimidos. Dos agentes atípicos é o que mais acomete idosos. A apresentação clínica varia de um quadro gripal auto-limitado (febre de Pontiac) que poupa o pulmão, até as formas mais graves com evolução para insuficiência respiratória. Opacidades alveolares (com broncograma aéreo) uni ou bilaterais e nodulações podem estar presente na radiografia do tórax. Raramente, há cavitação ou derrame pleural. Dos testes utilizados para o seu diagnóstico, a cultura tem sensibilidade baixa, em torno de 50% a 60% dos casos. A sorologia é mais útil na avaliação retrospectiva do diagnóstico, sendo que cerca de 25% dos pacientes não apresentam aumento significativo dos títulos. Testes para a pesquisa de antígeno (imunofluorescência direta e pesquisa de antígeno urinário) detectam apenas espécies de *L. pneumophila* sorogrupo 1 (Lp1), responsáveis por 70% a 80% dos casos. A PCR é um teste sensível e específico, capaz de detectar as várias espécies de *Legionella*. Pode também demonstrar a presença de organismos não cultiváveis e DNA livre, aumentando a chance de diagnóstico em pacientes parcialmente tratados empiricamente com antibióticos.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase do gene 5S rRNA.
Valor de referência
Negativo.
Condição
3,0mL de escarro; 3,0mL de lavado broncoalveolar (BAL); 3,0mL de líquido pleural ou 250mg de material de biópsia de pulmonar.
Laboratórios
Colher em tubo ou frasco estéreis.
Material de biópsia: congelar imediatamente e conservar em etanol.
Conservação para envio
Tecido: enviar em gelo seco.
Demais amostras: até 24 horas entre 2º e 8ºC.
Limitações do teste
Reações falso-negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste ou na presença de inibidores da PCR na amostra.

Leishmania, PCR

Comentários
A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. São transmitidas pela picada de um mosquito (flebótomo) que são normalmente encontrados nas regiões tropicais e subtropicais. Os reservatórios da *Leishmania* incluem roedores, cães e seres humanos infectados. Várias espécies do gênero são agentes etiológicos da leishmaniose visceral (LV), cutânea e mucocutânea. A leishmaniose visceral ou calazar é essencialmente causada pelo Complexo Donovani que inclui a *Leishmania donovani,* a *Leishmania infantum* e a *Leishmania chagasi*. A LV é fatal na ausência de tratamento e as drogas atualmente disponíveis são caras e causam sérios efeitos colaterais. Vários estudos têm demonstrado que a PCR (reação em cadeia da polimerase) é altamente específica e mais sensível do que métodos clássicos utilizados para o diagnóstico da leishmaniose e pode ser usada de rotina em humanos e cães.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase - PCR. A reação de amplificação define a presença do DNA do cinetoplasto da *Leishmania* sp.
Valor de referência
Amostra negativa para *Leishmania* sp.
Condição
5,0mL de sangue total (EDTA); 1,0mL de aspirado de medula óssea; 250mg de material de biopsia de lesões ou linfonodos.
Não usar medicação tópica nas 48 horas que antecedem o exame.
Laboratórios
Colher em tubo ou frasco estéreis.
Conservação para envio
Sangue: até 72 horas em temperatura ambiente.
Aspirado de medula óssea e linfonodos: até 24 horas em temperatura ambiente.
Material de biópsia: até 48 horas em etanol com gelo seco.
Limitações do teste
Reações falso-negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste ou na presença de inibidores da PCR na amostra.

Micobactérias, identificação em cultura por PCR

Comentários
O exame se destina à identificação rápida das várias espécies de micobactérias isoladas a partir do meio de cultura de qualquer material clínico (*M. tuberculosis, M. avium, M. intracellulare, M. fortuitum, M. kansasii, M. gordonae,* etc). Útil na avaliação do paciente que não está respondendo aos tuberculostáticos, ajudando a guiar decisões terapêuticas.
Veja também *Mycobacterium tuberculosis* PCR.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida da análise do perfil de fragmentação após digestão com enzimas de restrição (RFLP).
Condição
Colônias isoladas em meio sólido (tubos de Lowestein-Jensen ou placas Middlebrook 7H10 ou 7H11) ou 1,0mL de caldo de cultura (caldo Middlebrook 7H9).
Conservação para envio
Até 6 meses entre 2º e 8ºC. Não congelar.

MRSA, detecção por PCR

Comentários
Exame utilizado para pesquisa de *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) e *Staphylococcus* coagulase negativa resistente à Meticilina (MRSCN) em secreções e fluidos corporais. O ensaio de amplificação de DNA de *Staphylococcus* sp. É utilizado para a avaliação do paciente que não está respondendo ao tratamento quimioterápico prescrito, ajudando a guiar decisões terapêuticas e epidemiológicas. A pesquisa do gene *mecA* pela técnica de PCR é considerada o padrão ouro para a detecção de cepas de MRSA e MRSCN.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex – Multiplex PCR.
Valor de referência
Negativo.
Condição
- Swab de orofaringe, vagina, axilas ou vestíbulo nasal: colher com swab e frasco estéreis e enviar em meio de transporte Stuart.
- Secreções: colher em frasco estéril e enviar em meio de transporte Stuart.
- Urina, jato médio: colher preferencialmente no laboratório a 1ª urina da manhã ou aguardar um intervalo mínimo de 4 horas da última micção.
- Amostras já semeadas em meio de cultura.

Obs.: em caso de uso de antimicrobianos, aguardar, se possível, 7 dias após o término do medicamento para realização do exame.
Laboratórios
Colher em frasco estéril.
Conservação para envio
Até 3 dias após a coleta, entre 2º e 8ºC.

Mycobacterium tuberculosis, PCR (pesquisa)

Comentários
A tuberculose permanece como um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo. O diagnóstico rápido é essencial para o início do tratamento apropriado e controle dos contatos. Detecta diretamente o DNA da micobactéria nas amostras clínicas. Trata-se de técnica específica, sensível e rápida, permitindo o diagnóstico e tratamento precoce, auxiliando no controle de disseminação da doença.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.
Valor de referência
Negativo.
Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
5,0mL de escarro; 5,0mL de lavado broncoalveolar; 50,0mL primeira da manhã (após assepsia); 5,0mL de líquido pleural; secreção de orofaringe; 3,0mL de líquor; 5,0mL de líquido ascítico; 5,0mL de líquido sinovial; 5,0mL de fluidos corporais ou biópsia (conservada em etanol).
- Refrigerar e enviar o mais rápido possível.

Conservação para envio
Até 4 dias entre 2º e 8ºC.

Mycoplasma, PCR

Comentários
O *Mycoplasma genitalium* foi detectado no trato urogenital de dois pacientes com uretrite não-gonocócica (UNG) pela primeira vez em 1981. Experimentos recentes reforçam que esses patógenos são capazes de invadir os tecidos do trato urogenital causando doença. Somente com a aplicação dos métodos de amplificação do DNA foi possível o melhor esclarecimento da sua epidemiologia e patogenicidade. Além de agente causador de uretrite, o *M. genitalium* tem sido implicado em uretrite crônica, doença inflamatória pélvica e doenças articulares. Embora o *Mycoplasma hominis* também possa ser encontrado no trato urogenital de pacientes saudáveis, tendo sido cada vez mais implicado na patogênese de infecções urogenitais. Estudos experimentais e clínicos associam o *M. hominis* com pielonefrite aguda, estando presente em até 10% dos casos. Possui forte associação com vaginose bacteriana, estando presente em 2/3 dos casos. Da mesma forma, diversos estudos o correlacionam com doença inflamatória pélvica e febre puerperal.
Veja também Doenças sexualmente transmissíveis, PCR.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex – Multiplex PCR.
Valor de referência
Negativo.
Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
30,0mL de urina do 1º jato da manhã (após assepsia); secreção uretral ou secreção endocervical.
- Amostras uretrais: não urinar pelo menos 1 hora antes da coleta.
- Urina: não urinar por pelo menos 4 horas antes da coleta.
- Endocervical: a mulher não pode estar menstruada.

Laboratórios
Para amostras de raspado uretral e endocervical é necessário kit especial com swab e meio de transporte. Apropriados. Para amostra de urina, colher em frasco estéril.
Conservação para envio
Swab: até 10 dias em temperatura ambiente
Urina: até 3 dias da coleta entre 2º e 8ºC.

Mycoplasma pneumoniae, PCR

Comentários
O *M. pneumoniae* é o agente mais comum dentre os germes atípicos associados a um quadro de pneumonia comunitária. Na maioria das vezes é subestimado pelo difícil diagnóstico. Acomete preferencialmente escolares, adolescentes e adultos jovens. Os sintomas são generalizados ocorrendo normalmente faringite e traqueobronquite, podendo ou não haver acometimento do trato respiratório baixo. Inicialmente, há um infiltrado intersticial localizado, que pode evoluir com preenchimento alveolar difuso. Derrame pleural é muito incomum. Hipoxemia pode estar presente, com evolução franca para insuficiência respiratória em alguns casos. Manifestações articulares, hematológicas, hepáticas, renais, oculares e pancreáticas podem estar associadas. As limitações dos testes laboratoriais disponíveis levou ao desenvolvimento de técnicas de amplificação de seu DNA, que apresentam sensibilidade de 92% e especificidade de 100%.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase do gene da proteína P1 citoadesina.
Valor de referência
Negativo.
Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
Escarro, lavado broncoalveolar, swab de orofaringe, aspirado de nasofaringe e líquido pleural: volume mínimo de 1,0mL.
250mg de material de biópsia de pulmonar.

(continua)

Laboratórios
Swab de orofaringe: colher no kit de PCR de C. trachomatis (Roche) ou no meio de transporte rosa (Dulbecco's).
Demais materiais: colher em tubo ou frasco estéreis.
Material de biópsia: conservar em etanol e congelar imediatamente.
Conservação para envio
Lavado broncoalveolar, líquido pleural e swab: até 72 horas entre 2º e 8ºC.
Material de biópsia: enviar em gelo seco.
Limitações do teste
Reações falso-negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste ou na presença de inibidores da PCR na amostra.

Neisseria gonorrhoeae, PCR

Comentários
A infecção pela *Neisseria gonorrhoeae* é a segunda infecção mais notificada nos EUA, sendo o risco de transmissão em uma relação sexual com um(a) parceiro(a) doente de aproximadamente 90%. Geralmente, é assintomática nas mulheres (60%) e se não tratada pode determinar doença inflamatória pélvica, infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica. Em homens, a *N. gonorrhoeae* causa uretrite em 90% dos infectados, ocasionalmente resultando em epididimite. Raramente a infecção dissemina e causa quadro articular, meningite e endocardite. Infecção neonatal pode resultar em conjuntivite severa. Os ensaios moleculares permitiram a diminuição do tempo de diagnóstico e aumentaram a sensibilidade da detecção. A sensibilidade da PCR para *N. gonorrhoeae* é de 98%.
Veja também Doenças sexualmente transmissíveis, PCR.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex – Multiplex PCR.
Valor de referência
Negativo.
Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
30,0mL de urina do 1º jato da manhã (após assepsia); secreção uretral ou secreção endocervical.
- Amostras uretrais: não urinar pelo menos 1 hora antes da coleta.
- Urina: não urinar por pelo menos 4 horas antes da coleta.
- Endocervical: a mulher não pode estar menstruada.

Laboratórios
Para amostras de raspado uretral e endocervical é necessário kit especial com swab e meio de transporte. Apropriados. Para amostra de urina, colher em frasco estéril.
Conservação para envio
Swab: até 10 dias em temperatura ambiente
Urina: até 3 dias da coleta entre 2º e 8ºC.

Toxoplasmose, PCR

Comentários
O *Toxoplasma gondii* é um protozoário parasita intracelular obrigatório. Usualmente assintomática, a infecção é importante em imunocomprometidos, gestantes e naqueles com acometimento ocular. A infecção adquirida em imunocompetentes é sintomática em apenas 10% dos pacientes, a maioria com linfonodomegalia auto-limitada. Podem apresentar febre, urticária, hepatoesplenomegalia, rash maculopapular e corioretinite. Neste caso, o diagnóstico é facilmente estabelecido pelos testes sorológicos. A PCR está indicada nas seguintes situações: definir o diagnóstico no paciente imunodeprimido; na presença de acometimento do sistema nervoso central (SNC); detectar a presença de acometimento ocular; estabelecer o diagnóstico pré-natal e pós-natal da infecção congênita.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase Aninhada (Nested PCR) do gene B1 do *Toxoplasma gondii*.
Valor de referência
Negativo (o DNA do *Toxoplasma gondii* não foi detectado pela PCR).
Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
1,0mL de líquor; 250mg de material de biópsia; 1,0mL de líquido amniótico ou 5,0mL de sangue total (EDTA).
Laboratórios
Colher em tubo ou frasco estéreis.
Material de biópsia: congelar imediatamente após a coleta.
Conservação para envio
Líquor e líquido amniótico: refrigerar overnight.
Tecidos:concervar em etanol, congelar imediatamente e enviar em gelo seco. Não enviar em formol.
Sangue total: enviar em temperatura ambiente.
Limitações do teste
Reações falso-negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste ou na presença de inibidores da PCR na amostra.

Ureaplasma urealyticum, PCR

Comentários
A principal síndrome associada à infecção pelo *U. urealyticum* é a uretrite não-gonocócica (UNG). A maioria dos casos de UNG é causada pela *C. trachomatis*, sendo o *U. urealyticum* responsável por 20% a 30% dos casos restantes. Em mulheres, pode levar a complicações como salpingite, endometrite e corioamnionite. Prostatite e epididimite têm sido associadas a este agente em homens. É o organismo mais freqüentemente isolado no córion-âmnio, mesmo na presença de membranas intactas. Está associado com inflamação, parto prematuro, septicemia, meningite e pneumonia no recém-nascido. Em pacientes imunocomprometidos, *o U. urealyticum* está associado com artrite, osteomielite, pericardite e doença pulmonar progressiva.
Veja também Doenças sexualmente transmissíveis, PCR.
Método
Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex – Multiplex PCR.
Valor de referência
Negativo.
Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.
Condição
30mL de urina do 1º jato da manhã (após assepsia); secreção uretral ou secreção endocervical.
- Amostras uretrais: não urinar pelo menos 1 hora antes da coleta.
- Urina: não urinar por pelo menos 4 horas antes da coleta.
- Endocervical: a mulher não pode estar menstruada.

Laboratórios
Para amostras de raspado uretral e endocervical é necessário kit especial com swab e meio de transporte. Apropriados. Para amostra de urina, colher em frasco estéril.
Conservação para envio
Swab: até 10 dias em temperatura ambiente
Urina: até 3 dias da coleta entre 2º e 8ºC.

Vírus respiratórios, PCR qualitativa

Adenovírus - Coronavírus - Influenza A e B - Vírus Sincicial Respiratório - Coronavírus

Comentários

Esta técnica é capaz de detectar, em uma única reação, a maioria dos vírus associados às infecções das vias respiratórias: Adenovírus; Coronavírus; Vírus influenza A e B; Rinovírus, Vírus Sincicial Respiratório.

Método

Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex – Multiplex PCR.

Valor de referência

Negativo.

Condição

Lavado de nasofaringe, swab de nasofaringe ou lavado brônquico.

Lavado de nasofaringe: nos casos em que o material não pode ser aspirado, incline a cabeça do paciente cerca de 70º para trás, instile de 3 a 7mL de soro fisiológico estéril e reaspire. Enviar imediatamente.

Swab de nasofaringe: insira um swab cuidadosamente e o mais profundamente possível através das narinas, colha toda secreção existente e friccione as paredes da nasofaringe de forma a obter células. Ressuspender em aproximadamente 1mL de salina estéril (não enviar com swab de algodão).

Conservação para envio

Enviar imediatamente entre 2º e 8ºC.

Vírus Varicela-Zoster, PCR qualitativa

Comentários

O Vírus Varicela-Zoster (VZV) é o agente etiológico da varicela (catapora) e do herpes zoster. A presença de complicações são mais freqüentes quando a infecção primária ocorre após 12 anos de idade. As mais comuns são a encefalite, pneumonia e infecção secundária das lesões. Pacientes imunocomprometidos podem apresentar evolução desfavorável com infecção disseminada, pneumonite, hepatite e encefalite. Raramente, a transmissão congênita do VZV pode levar a infecção neonatal grave. As indicações da PCR são as seguintes: acometimento do sistema nervoso central; complicações oculares; lesões vesiculares atípicas; complicações pulmonares (por análise do lavado brônquico ou do tecido de biópsia) e infecção congênita, por análise do líquido amniótico a partir da 15ª semana.

Método

Reação em Cadeia da Polimerase Aninhada (Nested PCR) do gene 29 do VZV.

Valor de referência

Negativo.

Obs: este exame pode apresentar, embora raramente, resultados falso-positivo e falso-negativo, que é uma característica do método.

Condição

1,0mL de líquor; 250mg de material de biópsia no kit *Digene* ou em etanol; swab de vesícula no hit *Digene*; 1,0mL de líquido amniótico ou 5,0mL de sangue total (EDTA).

Conservação para envio

Líquor e líquido amniótico: refrigerar overnight.

Tecidos: congelar e enviar em gelo seco.

Sangue total: enviar em temperatura ambiente.

Limitações do teste

Reações falso-negativas podem ocorrer quando a quantidade de DNA está abaixo da sensibilidade de detecção do teste ou na presença de inibidores da PCR na amostra.