

2ª edição
Revista e Ampliada

CONDUTAS EM INFECTOLOGIA

Sergio Cimerman
Benjamin Cimerman

 **Atheneu**

Manoel Reinardo Schmal

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um imenso progresso no diagnóstico laboratorial devido ao desenvolvimento das diversas ciências da vida, tais como a biologia, a biofísica e a bioquímica, associado ao grande avanço no estudo de fenômenos naturais. Isso propiciou um avanço tecnológico aplicado em diferentes técnicas laboratoriais que, conseqüentemente, ajudaram a aperfeiçoar o diagnóstico em diversas especialidades clínicas, incluindo a infectologia. Assim, houve a possibilidade de detecção de diversos analitos em quantidades muito ínfimas na grandeza de picogramas (10^{12}) ou menores. Algumas descobertas foram essenciais para o desenvolvimento do diagnóstico laboratorial, entre as quais podem ser citadas a técnica de obtenção de anticorpos monoclonais, o desenvolvimento do imunoenensaio em todas as suas fases, a utilização do *laser*, a descoberta de enzimas de restrição e o aperfeiçoamento de outras técnicas de biologia molecular, como a amplificação da sequência de nucleotídeos (PCR). Diversos métodos laboratoriais amplamente empregados há mais de 40 anos são já considerados de um passado histórico, obsoletos e que caíram completamente em desuso, devido à sua falta de sensibilidade, especificidade e, às vezes, por seu empirismo ou complexidade técnica na sua execução. Atualmente, a maioria dos laboratórios clínicos trabalha com equipamentos automatizados, de alta tecnologia, que permitem o processamento de maior quantidade de amostras com menor volume de fluidos biológicos com maior rapidez, melhor desempenho, diminuindo o erro humano por equívocos na pipetagem, troca de amostras e leitura errônea, beneficiando, assim, o usuário final e o solicitante dos exames de laboratório. Mas, existem diversos exames laboratoriais que, com o correr do tempo, ainda são amplamente utilizados em infectologia e, às vezes, ainda considerados insubstituíveis, como o método de coloração de Gram (1893), ou outros métodos diagnósticos também antigos, entre eles a reação de VDRL e ASLO. Existe atualmente em situações de emergência, à beira de leitos ou em consultórios, a tendência a se realizar testes com dispositivos (*point of care testing*) para realizar o diagnóstico de uma determinada doença infecciosa e, então, poder adotar conduta terapêutica adequada ou medidas profiláticas ou de interesse epidemiológico. Deve-se ter muito cuidado na interpretação desses testes, que podem dar resultados ambíguos ou falsamente positivos e negativos, e que dependem

da experiência do executante bem como da qualidade dos sistemas de diagnóstico.

Algumas doenças infecciosas possuem quadros clínicos bem característicos, inclusive associados a antecedentes epidemiológicos, cujo diagnóstico se torna mais fácil. É bom lembrar que doenças exantemáticas, de diagnóstico mais raro, tornaram-se mais frequentes quando algumas doenças infecciosas foram praticamente erradicadas pela vacinação da população. Como exemplo, temos as doenças exantemáticas mais frequentes como a erradicação do sarampo. Diversas doenças infecciosas têm um largo espectro de sintomas e sinais clínicos de diversas síndromes clínicas. Muitas vezes há também a ocorrência de diversas doenças infecciosas com praticamente uma síndrome clínica. Como exemplo, podemos citar as várias infecções respiratórias que podem ser originárias tanto de agentes infecciosos virais quanto bacterianos, fúngicos ou parasitários. Convém lembrar que ocorrem quadros atípicos de doenças infecciosas com sintomatologia frustra ou modificada, em decorrência de vacinação prévia que já perdeu a eficácia ou à qual o hospedeiro não apresentou resposta imunitária eficiente. Pacientes imunodeprimidos por diversos fatores, como prematuridade, senilidade, desnutrição severa, doenças crônicas, imunossupressão química ou decorrente de síndromes de imunodeficiência congênita ou adquirida, poderão ter quadro clínico de doenças infecciosas diferente do de indivíduos normais. Lembremo-nos da existência de doenças emergentes ou reemergentes decorrentes de diversos fatores como mutação no agente etiológico, alterações ambientais, globalização, bioterrorismo, entre outras causas que deverão ser identificadas rapidamente, para as quais devem ser tomadas medidas curativas e de contenção. Pelos diversos fatores anteriormente citados, é impensável prescindir o uso do laboratório para identificação do agente etiológico pelos diversos recursos técnicos que o laboratório fornecerá, como ajuda para diagnóstico, tratamento e profilaxia na área da Infectologia.

OBJETIVOS

A utilização dos exames laboratoriais em Infectologia, bem como em outras especialidades médicas, não substitui a história e o exame laboratório clínico do paciente, bem como os antecedentes pessoais, familiares ou epidemiológi-

cos na realização do diagnóstico da doença infecciosa, mas é considerada um elemento complementar para efetuar ou confirmar o diagnóstico, bem como fornecer subsídios para a orientação terapêutica e controle evolutivo do paciente.

Os exames laboratoriais nas doenças infecciosas e parasitárias são utilizados para:

- definir os sistemas, órgãos ou líquidos biológicos comprometidos pela doença infecciosa,
- avaliar o paciente do ponto de vista hidroeletrolítico e metabólico;
- auxiliar na interpretação de alterações inespecíficas peculiares a doenças infecciosas agudas, tais como alterações hematológicas, que comumente ocorrem em doenças bacterianas e virais agudas; e dosagem quantitativa de analitos de proteínas de reação de fase aguda, que geralmente estão alteradas em processos infecciosos e inflamatórios agudos, como pré-albumina, α -glicoproteína ácida, β_2 microglobulinas, proteína C reativa (PCR), TNF (fator de necrose tumoral), interleucinas, fatores de coagulação etc.;
- fornecer dados relevantes para o controle da evolução clínica e prognóstico do paciente infectado, e informações sobre o estado imune do doente pela realização de fenotipagem linfocitária e pela detecção de marcadores antigênicos, e sua quantificação quando possível,
- objetivar diagnóstico etiológico das infecções clínicas, assim como fornecer, quando possível, subsídios para a terapêutica adequada para a cura clínica ou microbiológica.

DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO

É conseguido pela descoberta do agente causador da doença ou infecção em paciente com suspeita de doença infecciosa. Para isso, devemos considerar os fatores pré-analíticos que poderão nos ajudar na pesquisa do agente causador dessa doença, tais como antecedentes epidemiológicos, vigência de surto epidêmico, contato com doentes, animais, vetores, viagens, condições de habitação, alagamentos, alimentos suspeitos de estarem contaminados, uso de medicamentos etc.

AMOSTRA

O sucesso do isolamento do agente causador da doença infecciosa depende das condições da amostra, do seu manuseio, dos meios de transporte, armazenamento, bem como da fase clínica da infecção. As amostras de líquidos biológicos estéreis deverão ser coletadas em frascos estéreis e, conforme a suspeita de bacteremia, de infecções por bactérias anaeróbias, fungemia ou viremia, deverão ter procedimentos especiais de coleta. Amostras de regiões do organismo não estéreis deverão ser semeadas em meios apropriados contendo inibidores para favorecer o crescimento do microrganismo que se queira identificar. Convém sempre consultar manuais de coleta de amostras microbiológicas ou pedir informações ao laboratório de apoio. Além da coleta correta, dependem do sucesso na obtenção de um diagnóstico o transporte e a conservação da amostra em meios de transportes adequados, a conservação desta amostra clínica

em ótimas condições e a chegada rápida do material a ser examinado ao laboratório.

Um fator técnico que deve ser observado, além de precisão, exatidão, reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade analítica dos elementos a serem pesquisados, é a análise clínica dos testes laboratoriais empregados, que compreende a sensibilidade e especificidade clínica ou diagnóstica.

SENSIBILIDADE CLÍNICA

A sensibilidade clínica de um teste é a proporção de casos positivos de um total de pessoas que têm uma determinada doença. A frequência de resultados positivos de um total de casos da doença é conhecido como resultado verdadeiramente positivo (VP) e é expresso em porcentagem. Os resultados negativos dos casos positivos de doença são conhecidos como falso-negativos (FN). A fórmula para a expressão de sensibilidade em porcentagem é: $\% = (VP/VP + FN) \times 100$.

ESPECIFICIDADE CLÍNICA

A especificidade clínica de um teste é a proporção de valores negativos de um total de pessoas sem uma determinada doença. A frequência de resultados negativos de um total de casos livres da doença é conhecido como resultado verdadeiramente negativo (VN) e é expresso em porcentagem. Os resultados positivos dos casos livres de doença são conhecidos como falso-positivos. Especificidade em $\% = (VN/VN + FP) \times 100$.

VALOR PREDITIVO POSITIVO

O valor preditivo positivo (VPP) de um teste é definido como a probabilidade de um paciente com um teste positivo apresentar a doença.

VALOR PREDITIVO NEGATIVO

O valor preditivo negativo (VPN) de um teste é definido como a probabilidade de um paciente com um teste negativo estar isento da doença.

→ MÉTODO DIRETO

Como o isolamento do microrganismo pode demorar muito tempo, para realizar o diagnóstico de certeza devemos usar métodos diretos que poderão dar uma ideia ou, às vezes, o provável diagnóstico do processo infeccioso.

Baseia-se na visualização do agente etiológico diretamente da amostra clínica. Em geral, coloca-se o material biológico na lâmina de vidro ou realiza-se um esfregaço, utilizando-se um sistema óptico para visualização direta do agente etiológico que, na maioria das vezes, é realizada em microscópio normal. O material a fresco colocado em lâmina poderá ser visualizado em campo escuro para detecção de espiroquetas ou espirilos na amostra. Quando se examinam estruturas maiores, utilizamos lupa invertida apropriada. Normalmente empregam-se métodos de coloração, dependendo da suspeita clínica. Como exemplo veja a Tabela 1 1

- **Vantagens do método:** orientação rápida para o diagnóstico, terapêutica e medidas profiláticas de saúde coletiva.

- **Desvantagens:** em geral, falta de sensibilidade, pois no caso de microrganismos pequenos, deverá haver uma concentração muito grande deles para serem visualizados em campo microscópico de grande aumento (concentração maior que 10^5 bactérias por mL). A especificidade diagnóstica somente é boa com estruturas mais nítidas, como no caso de protozoários e metazoários, que poderão ser mais bem visualizados em pequeno e médio aumento ou com lupa, ou de alguns tipos de vírus em microscopia eletrônica.

IDENTIFICAÇÃO DO AGENTE ETIOLÓGICO

Para se identificar o agente etiológico causador de doença infecciosa, é necessário isolá-lo para possível identificação posterior por métodos bioquímicos, ópticos, imunológicos, moleculares, entre outros. Inicialmente, dependendo se o microrganismo foi isolado de áreas do corpo não estéreis, é necessário saber se o mesmo microrganismo não é patogênico e faz parte da flora normal do indivíduo. Em líquidos estéreis, como líquido, sangue, urina etc., o isolamento de um microrganismo é significativo, isto é, afastando-se hipótese de contaminação da amostra clínica processada. Classicamente, o diagnóstico de uma doença infecciosa deve preencher os postulados de *Koch*, ou seja, o agente microbiano deve ser observado nas lesões em caso de doença, cultivado e subcultivado em meios de cultura artificiais e reproduzir a doença quando inoculado em animal de experimentação suscetível. Esse critério não é mais absoluto, pois existem microrganismos que não são cultiváveis e não reproduzem a doença em animal de experimentação. Pela identificação de sequências gênicas específicas de microrganismos, por técnicas de biologia molecular, consegue-se confirmar o diagnóstico de agentes causadores de doença, outrora não identificados. O isolamento de agente infeccioso causador

de doença clínica é obtido pelo cultivo da amostra em meio de cultura adequado e deverá ser orientado de acordo com a suspeita de doença. Assim, o médico deverá fornecer dados para o diagnóstico laboratorial, pois os procedimentos para pesquisa de bactérias aeróbias, anaeróbias, leveduras, fungos, vírus e outros agentes infecciosos não são universais e são peculiares para cada grupamento. Dados epidemiológicos e de estágio da doença clínica são fundamentais. Assim, fatores como o tempo de incubação, temperatura, pH, osmolaridade, atmosfera, aditivos, inibidores enzimáticos e antibióticos do meio de cultura, soluções salinas ou linhagens celulares empregadas devem ser rigorosamente observados para se obter êxito nesse intento. A vantagem do cultivo, desde que se obtenha resultados positivos nos diversos tipos de amostras clínicas, tais como sangue total, plasma, líquido, urina, transudatos, exsudatos, secreções, fezes, biópsia e outros, e que sejam preenchidos quando possível preceitos anteriormente referidos, é o diagnóstico de certeza da doença. A cultura de microrganismos, quando eficientemente efetuada, é altamente sensível e específica. A desvantagem é que a cultura da amostra, dependendo do agente etiológico e do método de cultivo, pode ser muito morosa para se tomar uma conduta terapêutica, quando necessário. A positividade depende também da concentração de microrganismos na amostra analisada.

MÉTODOS INDIRETOS

Deteção antigênica: em virtude da demora em se realizar o diagnóstico devido ao tempo maior necessário para se obter um resultado da cultura, e da impossibilidade de se obter resultado pelo método direto de identificação do microrganismo responsável pela doença, em razão da baixa concentração deste ou pela ausência do mesmo devido ao uso de antibióticos ou outros fatores (como a conservação ou transporte deficiente do material para estudo, ou estágio mais tardio da doença clínica quando o isolamento do agente infeccioso se torna mais difícil), podemos ainda encontrar antígenos ou metabólitos produzidos por esses microrganismos ou partes de suas estruturas moleculares, que poderão fornecer subsídios valiosos para o diagnóstico do agente infectante. Nessas condições, recomenda-se o uso de testes rápidos e de fácil execução à beira do leito, extremamente rápidos e de sensibilidade e especificidade geralmente elevadas. Para a detecção de antígenos de agentes infecciosos em amostras clínicas, os testes mais utilizados são reações de aglutinação, precipitação e a imunofluorescência direta e o *immunodot*. Os testes de eleição de mais simples execução são as reações imunológicas de aglutinação de partículas, como látex, gelatina, hemácias, sensibilizadas com anticorpos.

- **Teste do látex:** caracteriza-se por partículas de látex revestidas de anticorpos específicos para o antígeno que se quer demonstrar existente na amostra. Misturando-se o anticorpo específico para determinado antígeno ligado ao látex com a amostra clínica em uma lâmina, verificamos reação de aglutinação observada visualmente, quando há reação antígeno-anticorpo.
- **Teste de coaglutinação:** é constituído de “proteína A” da parede de cepa de estafilococos ligada a anticorpo específico pela fração cristalizável da imunoglobulina. Neste teste também se observa visualmente reação

Tabela 1 1 Métodos de coloração comumente empregados em infectologia.

Método	Finalidade
Coloração de Gram	Diferenciar bactérias por morfologia e coloração
Método de Ziehl-Nielsen	Detectar bacilos álcool-ácido-resistentes
Auramina-rodamina	BAAR por autofluorescência
Alaranjado de acridina (AO)	Bactérias em sangue por autofluorescência
Lugol	Protozoários e metazoários
KOH a 10%	Fungos
Coloração de Giemsa	Protozoários em sangue e inclusões virais
Azul de toluidina	Pesquisa de pneumocistose em secreção
Azul de metileno	Leucócitos em fezes e secreções
Método de Albert	Corpúsculos metacromáticos
Tinta da China	Cápsula em criptococo
Imunofluorescência direta	Bactérias, leveduras, vírus
Microscopia eletrônica	Morfologia de partículas virais

de aglutinação quando há reação antígeno-anticorpo. As reações de precipitação mais comuns são os testes de difusão simples ou dupla, imunodifusão radial e a contraimunoeletroforese (CIE). Nas reações de precipitação, o encontro do antígeno (amostra clínica) com anticorpo específico em uma placa de agarose resulta em uma reação de precipitação visível e identificada a olho nu.

- **Contraimunoeletroforese (CIE):** este método já foi muito utilizado, porém, é mais complexo, pois caracteriza-se por uma reação de precipitação sob a corrente elétrica. Tem a desvantagem da necessidade de técnica de execução complexa, aparelhagem específica e maior quantidade de anti-soros e amostra. Nesse teste, quando a reação é positiva, temos uma linha de precipitação no encontro do antígeno da amostra com o anticorpo soro-específico, observada visualmente quando há reação antígeno-anticorpo.
- **Reação de imunofluorescência direta (IFD):** a amostra é fixada em lâmina e o anticorpo específico é conjugado a um material fluorescente, geralmente fluoresceína. Se houver encontro do antígeno da amostra com o anticorpo soro-específico, é exibida fluorescência de estruturas celulares, observada em microscópio fluorescente quando há reação antígeno-anticorpo. Quando o conjugado é a peroxidase, a reação é feita pela revelação da enzima com substrato precipitante e poderá ser observada em microscópio óptico comum.
- **Imunodot ou Imunocromatografia:** o anticorpo ou proteína específica de um agente etiológico é fixado em uma membrana plástica, geralmente nitrocelulose ou dispositivo plástico com filtros. Aplica-se a amostra clínica sobre a membrana e, a seguir, um anticorpo conjugado a uma enzima, fazendo-se, em seguida, a revelação com substrato precipitante. Se houver reação antígeno-anticorpo, a área aplicada da membrana ficará corada, sendo facilmente evidenciada. Outro método também utilizado é o teste de Elisa indireto. Desvantagens dos métodos indiretos são a sensibilidade dependente da quantidade de antígenos e a especificidade diminuída, em razão da qualidade do anticorpo, das reações cruzadas entre diversos antígenos, e condições da amostra clínica, como a quantidade de proteínas e enzimas proteolíticas, entre outros fatores interferentes.

Pesquisa de anticorpos por métodos imunológicos ou sorológicos

Os testes sorológicos são utilizados para confirmar uma doença infecciosa indiretamente, quando o agente etiológico não pode ser observado por método direto ou cultivado para realizar o diagnóstico de certeza. Também podem diferenciar uma infecção primária de uma secundária pelo perfil das imunoglobulinas encontradas. Auxiliam no diagnóstico de infecção congênita e neonatal. São úteis no controle evolutivo de uma infecção e para demonstrar cronicidade de uma infecção pela persistência de antígenos. Estudos epidemiológicos de incidência e prevalência de infecções clínicas e subclínicas em grupos populacionais são de estimado valor. Permitem verificar a eficácia de imunizações em saúde

coletiva ou em indivíduos de diferentes grupos etários. Em casos de infecções assintomáticas, imunossupressão por doença ou por agentes terapêuticos, bem como em transplantes de órgãos, a determinação de anticorpos de doenças oportunistas é essencial para controle profilático e terapêutica adequada. Para a detecção de anticorpos produzidos pela infecção do antígeno causador da doença clínica são empregados diversos tipos de testes imunológicos dependentes da facilidade de uso, número de amostras a serem testadas, sensibilidade e especificidade dos mesmos e a habilitação tecnológica de se elaborar antígenos específicos para o anticorpo a ser testado ou quantificado, quando possível. O teste mais antigo para estudo sorológico de doença infecciosa é a "reação de Widal" para diagnóstico sorológico da febre tifoide, criado na última década do século XIX. Consistia em reação de aglutinação direta, na qual o carreador da reação era a própria bactéria *Salmonella typhi* com antígenos físico-quimicamente tratados, que reagem com o soro de paciente seriadamente diluído em diversas concentrações padronizadas. A maior diluição em que ocorria aglutinação de partículas era considerada título de anticorpos presentes. Os testes sorológicos mais comumente utilizados, aqui descritos resumidamente, são: *reações de aglutinação direta*, cujo exemplo foi citado anteriormente, quando os antígenos pertencem ou ocorrem em células de agentes infecciosos ou em hemácias; *reação de aglutinação indireta*, quando os carreadores de antígenos podem ser: partículas de poliestireno (látex), hemácias naturais ou tratadas quimicamente de diversas espécies de animais, gelatina, bentonita etc., que na presença de anticorpos específicos demonstram aglutinação de partículas visíveis a olho nu ou em microscopia ótica; *reações de precipitação*, que compreendem os métodos de imunodifusão simples, dupla e radial, CIE, entre outros, e nessas reações, o antígeno solúvel se encontra com o anticorpo, formando banda de precipitação; *testes de floculação*, uma reação de precipitação com propriedades de aglutinação, formando, na reação antígeno-anticorpo, grumos e precipitados de partículas finas, sendo o antígeno da reação não solúvel, como por exemplo VDRL e RPR, *reações de fixação de complemento* (RFC), que já foram muito usadas antigamente, mas são ainda valiosas para o diagnóstico de certos vírus respiratórios e enterovírus. É um teste composto por duas fases, sendo a primeira o sistema teste formado por soro de paciente, antígeno e complemento; e a segunda, pelo sistema indicador constituído por hemácias de carneiro, hemolisina e complemento de coabaia. Se houver anticorpo específico ao antígeno, não se observa hemólise na reação; *reações de neutralização*, principalmente usadas em laboratório de virologia, onde se utilizam anti-soros específicos para determinar ausência de efeito citopático de vírus em linhagens celulares; *reações de inibição de hemaglutinação* (IHA), que se baseia na propriedade de certos vírus produzirem hemólise. Na presença de anticorpos específicos, essa hemólise é inibida, *testes de imunofluorescência ou imunoperoxidase indireta*, quando se fixam células em lâmina e a amostra com anticorpo se liga ao antígeno. Executa-se lavagem da lâmina para eliminação de anticorpos inespecíficos não ligados e adiciona-se, a seguir, antiimunoglobulina humana total ou anti-IgG, IgM ou IgA conjugada a material fluorescente, e analisa-se a existência de fluorescência dessas estruturas na lâmina fixada. No caso de o conjugado ser a peroxidase, a reação é feita pela revelação da enzima com

substrato precipitante e poderá ser observada em microscópio óptico comum. Imunoensaios utilizam conjugados marcados com enzimas – *ensaio imunoenzimático* (EIE) –, cujos marcadores da reação podem ser enzimas ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) ou isótopos radiativos para radioimunoensaio (RIA) ou substrato quimioluminescente e fluorogênicos.

O teste **ELISA indireto**, com suas diferentes variações, é, atualmente, o teste preferido para a identificação de anticorpos específicos para determinado agente infeccioso. Sua vantagem é a sua sensibilidade, o uso de pequenas quantidades de amostra clínica e reagentes e a possibilidade de execução de grandes quantidades de amostras clínicas, proporcionando economia de tempo e de custos. Além disso, o teste pode ser completamente automatizado em todas as etapas. É o teste ideal para inquéritos epidemiológicos populacionais. Baseia-se na aplicação de antígeno em suporte de material plástico, geralmente em superfície de cavidades de microplacas ou pérolas de poliestireno. Após lavagem, aplica-se amostra clínica de material biológico e incuba-se à determinada temperatura para haver união de antígeno com anticorpo específico. Novamente procede-se a lavagem para retirada de anticorpos inespecíficos que possam interferir no resultado. Na próxima etapa há adição de anti-globulina humana denominada conjugado, ligada a enzima que frequentemente é a peroxidase ou a fosfatase alcalina. O próximo passo é o emprego de um substrato que reagirá com a enzima. Após a incubação, ocorre uma reação de cor proporcional à quantidade de anticorpos presentes na reação quando se efetua a leitura em leitor de placas a determinado comprimento de onda. Esta reação é expressa em densidade óptica ou absorbância, e comparada a um controle chamado de branco. Por métodos estatísticos (ou outros) calcula-se o valor de corte ou *cut off*, também chamado de limiar de reatividade mínima. Valores acima deste *cut off* são considerados positivos e, abaixo, negativos. Quando a reação de cor for intensa, poderá ser visualizada a olho nu. As variantes do teste são grandes, o que permitiu melhorar o desempenho dos resultados, aumentar a sensibilidade e especificidade dos testes e diminuir o tempo de latência da detecção de imunoglobulinas. Outra variante comum é a detecção do anticorpo por *método competitivo*. Neste, em uma cavidade da placa adiciona-se quantidade conhecida de anticorpo em solução juntamente com a amostra a ser testada. Se houver antígeno presente nessa solução, ele competirá com o anticorpo presente, inibindo a reação deste com o antígeno fixado na cavidade da microplaca, resultando em diminuição ou ausência de reação em caso de positividade do teste. Um teste muito usado para determinação de anticorpos anti-IgM é o *método de captura* para IgM, que consiste na fixação em cavidades de microplacas ou pérolas de anticorpos anti-IgM humano que se ligam ao IgM existente na amostra. A seguir, é adicionado o antígeno e, então, um anticorpo contra o antígeno conjugado à enzima ou outro marcador. Uma das desvantagens do ELISA é que a absorbância não se correlaciona sempre quantitativamente com a taxa de anticorpos. Atualmente o imunoensaio, quando possível, por sua facilidade de execução e pela possibilidade de processar grande número de amostras, e pela possibilidade de automação e sua alta sensibilidade de automação tornou-se o método de escolha para detecção de anticorpos. Considerando-se as doenças infecciosas, que requerem diagnóstico de certeza por sua gravida-

de e transmissibilidade, e resultado precoce no diagnóstico sorológico para tentar diminuir o período de detecção de anticorpos ou janela imunológica, foram desenvolvidos testes mais sensíveis e específicos. Hoje, para algumas infecções como HIV e outras, a sensibilidade e a especificidade desejáveis é de 100% ou valor próximo. Foram desenvolvidos testes em que houve mudança tecnológica em praticamente todas as suas fases. Assim, em vez de o antígeno ligar-se a pérolas, liga-se a micropartículas de poliestireno para aumentar a superfície de adsorção a anticorpos. Os antígenos são proteínas específicas produzidas por técnica de gene recombinante ou são peptídeos sintéticos. O anticorpo secundário reage especificamente contra o antígeno e é conjugado a um sistema de amplificação tipo avidina-biotina dirigido ao antígeno (a biotina é aderida à superfície da imunoglobulina e tem alta avidéz pela avidina conjugada à enzima; já o substrato é quimioluminescente para melhorar a sensibilidade). Assim, o teste clássico de ELISA indireto é chamado de primeira geração. No teste de ELISA de segunda geração, os antígenos são proteínas ou glicoproteínas por gene DNA recombinante e a imunoglobulina conjugada ainda é anti-humana, podendo ser obtida por método amplificado, como anticorpo biotilado e avidina peroxidase. No ELISA de terceira geração, o suporte do antígeno pode ser melhorado pela ligação antigênica a micropartículas e os antígenos são proteínas por gene recombinante ou sintéticos específicos para os diferentes anticorpos. Estes, quando capturados pelos antígenos, são detectados por proteínas e peptídeos específicos ligados à enzima, e o substrato pode ser quimioluminescente, por ser mais sensível. Testes rápidos para detecção de anticorpos contra HIV ou outros antígenos infecciosos já são comercializados e úteis para orientação em condutas médicas ou terapêuticas de urgência, como por exemplo, em cirurgias de urgência ou início de tratamento antimicrobiano, em que são executados pelo método imunoenzimático.

Imunodot ou Imunocromatografia: os antígenos ou proteínas específicos de um agente etiológico são fixados em uma membrana plástica, geralmente nitrocelulose ou dispositivo plástico com filtros. Aplica-se a amostra clínica sobre a membrana e, a seguir, um anticorpo conjugado a uma enzima, fazendo-se, em seguida, a revelação com substrato precipitante. Se houver reação antígeno-anticorpo, a área aplicada da membrana ficará corada, sendo facilmente evidenciada. O teste deverá ser feito no mesmo dispositivo com controles positivos e negativos. A vantagem desses testes é a alta rapidez de execução, com sensibilidade e especificidade comparáveis ao teste de ELISA.

Teste de Western Blot: o material do agente etiológico isolado é submetido à lise por ação de detergente (SDS) e realizada eletroforese em poliacrilamida (PAGE), que separa as proteínas por peso molecular e carga elétrica. Em seguida, esse mesmo material é transferido para tiras de nitrocelulose. Estas são incubadas com soro de paciente e soro controle-positivo com todas as bandas presentes, ligeiramente positivos e negativos. Os anticorpos reagirão com as proteínas existentes no soro. A seguir, realiza-se lavagem da tira para retirar material inespecífico, incubando-a com anticorpo anti-humano conjugado à enzima. Adicionando-se o substrato precipitável, é possível observar bandas de proteínas ou glicoproteínas correspondentes a anticorpos específicos ao agente infeccioso. O resultado deve ser comparado com soros-controles.

A escolha do teste imunológico a ser usado depende do custo, da facilidade de execução e da existência de equipamentos especializados, bem como da habilidade e do treinamento do executante dos testes e do desempenho dos mesmos em relação ao padrão ouro (*gold standard*). Além da sensibilidade e especificidade das diferentes técnicas, podem ocorrer variações no desempenho dos testes de diversos fabricantes ou variações em diversos lotes, daí a necessidade de executar, em cada rotina de soro, controles positivos e negativos, além de controles de qualidade internos e externos de *kits* de exames. Deve-se ficar atento, principalmente nas técnicas de aglutinação e precipitação, a fenômenos "prozona" (excesso de antígeno em relação ao anticorpo) e também, em geral, a reações cruzadas e fatores interferentes das reações antígeno-anticorpo, tais como avidéz, afinidade e emprego de insumos de qualidade. É preferível o uso de antígenos purificados ou sintéticos e anticorpos monoclonais nas técnicas de detecção de anticorpos por métodos imunológicos. Os testes de laboratório estão sujeitos a erros devido a fatores humanos ou de instrumentação, ou ainda pelo tipo de amostra, havendo a necessidade de sempre interpretar os resultados com base nos dados clínicos e hipóteses de diagnóstico. Quando houver dúvidas, deve-se rever o caso.

→ Convém lembrar que, para o diagnóstico individual ou inquéritos epidemiológicos, podem ser empregados testes de intradermorreação tardia, que consistem em injeção intradérmica de diluição padronizada de antígenos com leitura após 48 horas do halo de eritema ou endureção, para verificar imunidade celular. Esses testes apresentam valor diagnóstico ou são utilizados para verificar a prevalência de infecção específica em estudos populacionais.

Demonstração de metabólitos de agentes infecciosos na amostra clínica

A demonstração de metabólitos constitui-se em método de valia para o diagnóstico de uma infecção. Os métodos mais utilizados são: cromatografia líquida gasosa (GLC), cromatografia líquida de alta pressão ou *performance* (HPLC) ou métodos enzimáticos ou bioquímicos. Como exemplos podemos citar o estudo do perfil de ácidos graxos para o diagnóstico de espécies bacterianas anaeróbias, classificação de espécies bacterianas, fração ramificada 10 ME-C18:0 de ácido tuberculostearico para diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* etc. Os métodos cromatográficos não têm aplicação clínica grande, pois são mais utilizados em centros de pesquisa por exigirem equipamentos mais completos e treinamento especializado. Como método empírico para diagnóstico de tuberculose em líquidos biológicos, citamos a determinação da aminodeaminase (ADA).

Diagnóstico molecular pela utilização de sondas (*probes*) genéticas

Entende-se como sonda genética uma sequência de ácidos nucleicos marcada, complementar a uma sequência a ser detectada e que é denominada alvo (*target*), que pode ser de ADN ou ARN. Hibridização molecular é a formação de uma dupla fita de moléculas de ácido nucleico complementar a uma simples fita de moléculas de ácido nucleico. O material a ser testado, que pode ser uma cultura bacteriana ou amostra clínica, é em geral aplicado a um suporte sólido que, normalmente, é um filtro de náilon ou lâmina. Esse

material é tratado para se tornar uma fita simples de DNA. A sonda, que é uma fita simples de ADN, reage com o material genético fixado se eles forem complementares entre si, isto é, se houver hibridização. A positividade da reação no filtro é verificada quando o marcador da sonda, que pode ser de material radioativo, enzimas, substâncias quimioluminescentes ou de outra natureza, for revelado ou processado, o que pode resultar em pontos densos em radiografias ou reação de cor. A hibridização também poderá ser realizada em meio líquido ou *in situ*, quando é demonstrada em células e cortes histológicos. A vantagem do teste é que o material fixado, sendo ADN, é estável por longo período e não precisa ser viável ou não cultivável, como o HPV. O método tem desvantagens, pois pode haver reação cruzada e a sensibilidade é baixa; em geral há necessidade de cultivo do microrganismo a ser testado. Existem marcadores, sendo os radiativos mais sensíveis. Os marcadores que se equiparam aos radiativos são os quimioluminescentes. Já existem diversos sistemas no mercado dirigidos para microrganismos de difícil cultivo. As vantagens do uso de *probes* ou sondas comercializadas são: especificidade, rapidez no diagnóstico, padronização e detecção de infecções quando o microrganismo não for detectável e não viável.

Diagnóstico molecular por amplificação gênica

Há agentes etiológicos de infecções que não são cultiváveis e que são de difícil isolamento quando têm crescimento lento ou presença escassa em amostras clínicas, como por exemplo vírus de papilomavírus (HPV), hepatite C, algumas micobacterioses e outros organismos fastidiosos como do gênero *Erlichia*, *Borrelia*, *Treponema* entre outros. Atualmente, por meio de técnicas de amplificação gênica, é possível o diagnóstico etiológico a partir de amostras de material genético. Na amplificação gênica, a partir de *primers*, ou iniciadores específicos, podemos, pelo encontro de sequência específica de ADN ou ARN, amplificar o segmento por mais de 25 ciclos em progressão geométrica e conseguir demonstrar a sequência molecular específica do agente etiológico procurado. O método mais conhecido é a Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*

PCR), pelo qual se consegue um aumento exponencial de uma sequência de DNA pesquisada, específica para o agente etiológico procurado. É uma técnica dependente de *primers* e de temperaturas elevadas para realizar a amplificação de uma sequência específica de DNA. Para efetuar essa reação são necessários o DNA da amostra testada, o controle da reação, a solução salina contendo desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), um par de *primers* que correm em sentido oposto para anelamento, e a enzima Taq polimerase ou enzima de polimerização termorresistente. Cada ciclo de reação se processa em três etapas: a. desnaturação do DNAs de dupla banda (ds) a 94°C, para formar duas bandas simples (ss) de DNAss; b. anelamento dos *primers* às regiões complementares a 55°C; c. extensão a 72°C, quando ocorre a síntese do DNAs sob ação da polimerase. Após 25 a 40 ciclos é feita a detecção do produto amplificado por gel eletroforese em agarose ou por outros métodos. A presença de sequência de DNA deve ser interpretada criteriosamente, associada a parâmetros clínicos. Deve-se tomar cuidado com falso-positivos devido à contaminação por problemas técnicos. Existem diversas formas de reação de PCR, tais

como RT PCR para RNA, Nested PCR com dois pares de *primers*, Multiplex com vários *primers*, AP-PCR com *primers* arbitrários e atualmente se realiza o PCR quantitativo, ou seja, considerando a carga viral, um teste importante para quantificar infecções virais para estadiamento e controle clínico da doença. O método PCR é utilizado para encontro de microrganismos não cultiváveis, microrganismos de crescimento vagaroso ou microrganismos desconhecidos, caso em que se usam *primers* universais para bactérias, ou pelo sequenciamento de fração 16S de RNA ribossômico. Pode ser empregado para subtipagem de microrganismos como por exemplo HBV, HPV, hepatite C e HIV. É recomendado para detecção de resistência a quimioterápicos antimicrobianos e determinação de carga viral, como hepatite C e HIV.

Peculiaridades no diagnóstico de infecções bacterianas

Para o diagnóstico clínico de infecções bacterianas, informações da história clínica e aspectos epidemiológicos deverão ser fornecidos pelo médico para que o material de pesquisa enviado seja corretamente manipulado e para que possibilite cultivar as bactérias em meios de cultura adequados, fatores já assinalados no tópico Diagnóstico Etiológico. Em caso de dúvidas sobre coleta, transporte de material e tempo necessário para que ele seja entregue ao laboratório, esse material deverá ser consultado e espera-se que esses tópicos sejam relatados em manuais de coleta. Cuidados deverão ser maiores em amostras estéreis e naquelas em que há suspeita de bactérias fastidiosas, sensíveis à alteração de temperatura, e que deverão ser rapidamente processadas. Como exemplo, podemos citar as *Neisserias* e *Haemophilus* encontráveis no líquido de pacientes com suspeita de meningite bacteriana. Para isolamento de bactérias anaeróbias, os meios de transporte e culturas são especiais, sendo que convém avisar previamente o laboratório para que se programe para esse procedimento. Em suspeita de bacteremia ou septicemia usam-se frascos apropriados para coleta e também exclusivos quando são processados para equipamentos de hemocultura automatizados. Cuidados pré-analíticos de assepsia na coleta de material, volume mínimo de sangue colhido, temperatura do frasco de coleta e tempo de envio ao laboratório deverão ser observados para obter resultados satisfatórios. Nunca se deve coletar amostras de líquidos biológicos normalmente estéreis em frascos não esterilizados ou com lacre violado ou prazo de validade vencido. Em geral, os procedimentos utilizados para isolar e caracterizar agentes bacterianos seguem as regras normais, ou seja, são efetuadas as bacterioscopias por diversos métodos de acordo com a hipótese diagnóstica, culturas em meios sólidos, semi-sólidos, líquidos não seletivos, enriquecidos, seletivos, inibidores específicos e diferenciais e incubados em aerobiose ou anaerobiose ou ambientes capneicos e em temperaturas adequadas, conforme a bactéria a ser isolada, como requisitos para isolamento de colônias puras. A identificação de bactérias é efetuada pelo estudo da sua ação sobre uma série de meios bioquímicos, incluindo fermentação, oxidação, degradação de açúcares, aminoácidos, ação enzimática sobre diferentes substratos, sorotipagem e, finalmente, testes de suscetibilidade a antibióticos e quimioterápicos para fins terapêuticos ou detecção de perfis de resistência de gêneros ou

espécies patogênicas. Os meios de identificação diferem de acordo com o grupo bacteriano isolado e se diferenciam pela morfologia e coloração pelo método de Gram, hemólise, tamanho e aspecto de colônias bacterianas. Existem perfis de resultados característicos para diferenciar gêneros e espécies das diversas cepas bacterianas isoladas. Há equipamentos automatizados com dispositivos apropriados para colocação de amostras e que permitem leitura rápida dos resultados em relação aos métodos convencionais, que inclui a identificação da espécie bacteriana com o auxílio da realização de antibiograma. Em geral, o antibiograma clássico é realizado pelo método de disco difusão de Kirby Bauer, cujos discos de papel de filtro seguem normas internacionais, com diâmetro e concentração de antibióticos padronizados, e tabelas contendo a variação de diâmetro de halos para conceituar sensibilidade ou resistência a cada antibiótico. Em casos especiais, podem ser empregados métodos de diluição em tubo e difusão em disco por gradiente denominado "E test." Dependendo do agente etiológico e do perfil de resistência, a presença de β -lactamase ou ESBL (betalactamase de espectro estendido) dessa bactéria, ou sensibilidade à novobiocina ou metilicina, podem ser avaliadas. Pode-se verificar, também em casos especiais, a existência de fatores de resistência por intermédio de métodos moleculares genéticos, como por exemplo PCR, sondas genéticas ou ainda o encontro de plasmídeos, entre outros, relevante em estudos epidemiológicos de infecções hospitalares. Em pacientes específicos, como os renais crônicos, há a possibilidade de se dosar a quantidade de antibiótico presente no soro para detectar níveis tóxicos ou subinibitórios de concentração dos antibióticos.

Diagnóstico laboratorial em doenças fúngicas

Nessas doenças, o exame direto da amostra em microscopia pelos métodos citados é mais fácil devido ao fato de as estruturas, maiores, serem facilmente identificáveis, bem como no exame do material de colônias desenvolvidas em meio de cultura para fungos, apesar de exigir bom treinamento do técnico para realizar esse diagnóstico. A hemocultura é desejável na suspeita clínica de candidíase, principalmente em pacientes imunodeprimidos. Em suspeita de pneumocistose, a pesquisa de *Pneumocystis* é executada com técnica de coloração especial de amostras de secreção brônquica. Em casos especiais, principalmente em espécies de *Candida*, é indicado o fungigrama para determinação de resistência. A pesquisa de antígeno por *Criptococcus* é realizada por meio de teste de látex. A detecção de anticorpos é realizada nas seguintes doenças sistêmicas: imunodifusão em paracoccidiodomicose e histoplasmose e ELISA indireto, indicado para suspeitas clínicas de histoplasmose, coccidiodomicose, assim como testes de intradermoreação, indicados para estudos populacionais de incidência de infecção ou para casos isolados.

Diagnóstico de infecções virais

O diagnóstico de infecções virais tornou-se mais interessante e primordial com o incremento da aplicação da terapia antiviral e o aperfeiçoamento de recursos de diagnóstico laboratorial dessas doenças. A indicação do diagnóstico viral é realizada principalmente para confirmação do diagnóstico clínico, para introdução de terapia viral, para tomada de decisões urgentes dependentes desse diagnóstico e para fins epidemio-

lógicos. O isolamento de vírus por cultura, apesar de ser lento e necessitar de infraestrutura para manutenção de linhagens celulares, técnicos especializados e ter custo elevado, é ainda o método ideal para o diagnóstico de certeza da infecção viral em amostras biológicas, por sua alta especificidade. Como existem vírus que não são cultiváveis, ou cuja cultura é muito difícil, utilizam-se técnicas de genética molecular para realizar tal diagnóstico. Como exemplo citamos os vírus que causam gastroenterite, o papilomavírus e os vírus de hepatites. Assim, em caso de pandemias potenciais, quando se necessita da detecção rápida do agente infeccioso viral e efetuar medidas preventivas para evitar sua disseminação, esse recurso torna-se muito útil para detecção do agente etiológico. Para o isolamento primário de um vírus requer-se a inoculação da amostra em linhagens celulares ou em camundongos recém-nascidos ou ovos embrionados ou ainda em outros sistemas hospedeiros. O sistema mais conveniente é a cultura do vírus em linhagens celulares de monocamada, quando se observa o efeito citopático (CPE) no tubo de cultura por exame do material em microscopia comum, que é variável para diferentes grupos de vírus. Podem ser observados agrupamentos de células inchadas, refringentes, arredondamento, lise ou formas sinciciais de células. A sensibilidade de linhagens de culturas celulares pode ser diferente nos diversos tipos de vírus. Alguns vírus não produzem efeito citopático ou necessitam de sistema indicador para serem evidenciados, como hemácias para verificar o evento de hemadsorção comum aos vírus influenza e parainfluenza, ou a demonstração de placas quando a monocamada de células é recoberta com meio semissólido, quando a formação de placas – evidenciada por corante – representa lise celular e são expressas como *unidades formadoras de placas* (PFU). A utilização de linhagem de linfócitos humanos é corrente no isolamento de Epstein-Barr, de alguns vírus do grupo herpes, do HIV e do HTLV1 e 2 em laboratórios de pesquisa.

Método Shell Vial de Centrifugação de Culturas: é um método que permitiu um avanço no diagnóstico mais rápido de infecções, principalmente do grupo herpes, que é de gravidade maior em pacientes imunossuprimidos. Consiste em tubo com lâmina, com monocamada de linhagem celular e com meio de cultura. Ao mesmo adiciona-se a amostra clínica e realiza-se então centrifugação em baixa rotação do tubo por 30 minutos. Após incubação por período de 24 a 48 horas a 37°C, fixa-se o conjugado imunofluorescente anti-antígeno do vírus na lâmina do tubo e, então, examina-se a mesma em microscópio de imunofluorescência para detectar o antígeno. Assim, por exemplo, uma infecção citomegálica, que por método clássico demora de três a quatro semanas para ser detectada, pode ser demonstrada em até 24 horas.

Por método direto de diagnóstico temos a detecção de inclusões citoplasmáticas e nucleares por microscopia óptica de amostras, cuja sensibilidade e especificidade não são elevadas, e pela identificação por microscopia eletrônica de estruturas virais, indicada para: diagnóstico de lesões vesiculares de pele como varicela, herpes, vaccínia etc., vírus dificilmente cultiváveis, como os relacionados a gastroenterites (por exemplo, Norwalk, adenovírus, rotavírus); vírus presentes em secreções brônquicas, bem como aqueles que podem ser encontrados em outros tipos de secreções. As vantagens da microscopia eletrônica são a rapidez e a desnecessidade de cultura; as desvantagens são a baixa sensibilidade, a dificuldade em distinguir estruturas semelhantes e, também, a

necessidade de operador com alta experiência, assim como seu custo elevado, o que leva a realização do procedimento principalmente em centros de pesquisa e universidades.

A imunofluorescência direta também é empregada para diagnóstico de algumas infecções respiratórias, entre elas aquelas associadas ao vírus sincicial respiratório, à influenza, adenovírus e parainfluenza. As vantagens deste método são a sensibilidade e rapidez, e as desvantagens seriam a dificuldade de coleta, necessidade de experiência técnica e a utilização de reagentes caros.

A detecção de antígeno é executada por aglutinação de partículas, imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático ou ELISA indireto, imunodot e RIA. Para detecção de anticorpos utilizamos vários métodos imunológicos semelhantes aos empregados para detecção de antígenos. As dificuldades encontradas, já foram mencionadas anteriormente, como a não detecção de anticorpos nos períodos iniciais da infecção, diferenciação de infecção primária da secundária, definição de infecção atual e progressa, e comportamento diferente de anticorpos em infecções congênitas e imunodepressão. Para detecção de anticorpos, a reação de fixação de complemento ainda é utilizada como padrão para algumas infecções virais, e as reações de neutralização são ainda usadas rotineiramente. Nelas utiliza-se antissoros específicos para neutralizar vírus específicos em amostras simples ou pareadas, assim como também são empregadas reações de inibição de hemaglutinação para detecção de anticorpos, principalmente para os vírus influenza, parainfluenza, dengue e mixovírus. Os métodos de eleição para a determinação de anticorpos virais são o ensaio enzimático, de preferência com metodologia atualizada, e a reação enzimática amplificada de reação antígeno-anticorpo. Eles são empregados para diagnóstico de HIV, infecções do tipo TORCH (“toxoplasmose” não viral), rubéola, citomegalovírus, herpes), HTLV, dengue, hepatites A, B, C, D, E etc. Grandes problemas da determinação de anticorpo são a reação cruzada, presença de fator reumatoide, a avidéz de anticorpos e falso IgM, devido ao excesso de IgG competindo com o IgM, que podem ser diminuídos pelo método ELISA, de captura, já anteriormente descrito. Testes para demonstrar resistência a quimioterápicos antivirais já são usados em condições especiais e experimentais.

Métodos moleculares: sondas marcadas (*probes*) são amplamente usadas no diagnóstico por meio de técnicas de hibridização de papilomavírus humano (HPV), e é feita a subtipagem para verificar subtipos potencialmente oncogênicos. Para fins diagnósticos são utilizados métodos de amplificação gênica qualitativos para HIV, hepatites B, C e G; para controle terapêutico e de evolução clínica efetua-se a determinação do número de partículas virais replicadas ou de carga viral por testes quantitativos descritos no tópico Diagnóstico Molecular por Amplificação Gênica.

Considerações no diagnóstico laboratorial de doenças parasitárias

As condições pré-analíticas de coleta e transporte de material devem ser observadas tanto para fezes como para secreções, excreções e sangue. Para o diagnóstico de doenças parasitárias de origem animal, devemos levar em consideração o ciclo evolutivo dos diversos parasitas, para o entendimento das doenças e sua interpretação. Assim, exis-

tem parasitas que possuem ciclo de circulação peculiar, bem como alguns com ciclo de migração para órgãos definidos ou de eliminação pelas fezes de forma cíclica, como filária, giárdia, áscaris etc. Estruturas macroscópicas de larvas ou de ovos de certas parasitoses, como por exemplo as larvas de nematoides ou proglotes de cestódeos, podem ser examinadas e classificadas a olho nu, com lupa ou microscópio tipo invertido, com pequeno aumento. Normalmente, a maioria dos parasitas intestinais pode ser observada no microscópio comum, com material fecal montado em lâmina a fresco ou examinada com coloração permanente. Conforme o tipo de parasita fecal, existem métodos de concentração de fezes característicos para sua detecção. Técnicas de coloração são diferentes dependendo das espécies procuradas, como por exemplo para espécies de *Cryptosporidium*, *Isospora* e *Microsporidia*. Para o diagnóstico de espécies que parasitam o sangue, medula óssea e sistema retículo-endotelial usam-se procedimentos de coleta e coloração especiais, como a coloração de Giemsa e a gota espessa para malária. Geralmente, na maioria das parasitoses, o método diagnóstico do agente etiológico é direto, sendo outros métodos menos utilizados, como a realização de cultura dos parasitas. O diagnóstico sorológico é mais empregado para infecções sistêmicas, dentre as quais as principais são a determinação de anticorpos para o diagnóstico de leishmaniose visceral, doença de Chagas, toxoplasmose e amebíase extraintestinal. Existem no mercado *kits* para diagnóstico por aglutinação indireta e hemaglutinação indireta, imunofluorescência indireta e

ELISA, ou ainda ensaio enzimático (EIE) para IgG e IgM dos agentes etiológicos anteriormente referidos. Métodos moleculares de amplificação, como o PCR, para parasitas de isolamento difícil, já foram desenvolvidos, mas não introduzidos em testes de rotina laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 9th ed. St. Louis: Mosby-Yearbook, 1994.
- Granoff A, Webster RG (Eds.). Encyclopedia of virology. 2nd ed. v.1 San Diego: Academic Press, 676p. p. 395-402, 1999.
- Henry JB, M.D. (Ed.). Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 19th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996; 1555p. p.1083-1334, 1334-1353.
- Koneman EW, Allen SD, Schreckenber PC, Winn WC (eds). Atlas and textbook of diagnostic microbiology. 4th ed. Philadelphia: JB Lippincott, 1992.
- Mahon CR, Manuselis G Jr. Textbook of Diagnostic Microbiology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co.,1995.
- McIntosh K. Diagnostic virology. In Fields BN, Knipe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B. Fundamental virology. 2nd ed. New York: Raven Press, 1990; 1267p.
- Murray PR, Baron EJ, Phaller MA, Tenover FC, Tenover RH. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999.
- Murray PR, Koobayshi GS, Pfaller MA, Rosenthal KS. Medical microbiology. 2nd ed. London: Mosby Co.,1994, p. 755.