

# APLICAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE IN HOUSE NO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO POR *C. TRACHOMATIS*

APPLICATION OF AN *IN-HOUSE* POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE  
LABORATORY DIAGNOSIS OF *C. TRACHOMATIS*

Claudete F Seadi<sup>1</sup>, Rejane Oravec<sup>2</sup>, Beatriz von Poser<sup>3</sup>,  
Vladimir V Cantarelli<sup>4</sup>, Maria Lucia Rossetti<sup>5</sup>

## RESUMO

**Introdução:** A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria sexualmente transmissível, de grande impacto no sistema reprodutivo das mulheres. O diagnóstico é crítico devido à frequência de infecções assintomáticas. As técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) apresentam maior sensibilidade do que os testes de imunodeteção, mas são de alto custo quando comerciais. Desenvolvida com insumos produzidos no laboratório, a PCR (*in house*) é viável quanto ao custo, embora exija rigorosa validação técnica e profissionais experientes. **Objetivo:** Aplicar a técnica PCR *in house* na detecção de *C. trachomatis* em amostras endocervicais e comparar os resultados com os métodos comerciais. **Métodos:** Foram analisadas 65 amostras provenientes de mulheres com solicitação médica de pesquisa de *C. trachomatis* por ensaio imunoenzimático em laboratório privado ou, de mulheres atendidas na rede pública dedicada a DST (Porto Alegre). A PCR *in house* foi comparada com testes comerciais. Estes, sendo coincidentes no resultado, classificavam as amostras como verdadeiramente positivas (VP) ou verdadeiramente negativas (VN). **Resultados:** A PCR *in house* detectou 63% e 50% das amostras VP selecionadas através dos métodos imunoenzimático/PCR-Amplificador e imunofluorescência direta/PCR-Amplificador, respectivamente. Ensaios em paralelo com controles compararam as sensibilidades e obteve-se uma unidade logarítmica inferior para a PCR *in house* com relação ao PCR-Amplificador que apresentou uma unidade logarítmica inferior a PCR-anidada. **Conclusão:** A aplicação da PCR *in house* demonstrou ser necessário aprimorar o método de detecção de amplificação tornando-o mais sensível, eficiente e ampliar o número de amostras. O custo inicial na implementação da PCR *in house* compensa-se pelo custo elevado dos testes comerciais.

**Palavras-chave:** reação em cadeia da polimerase, *C. trachomatis*, amostras endocervicais

## ABSTRACT

**Introduction:** *Chlamydia trachomatis* is a sexually transmitted bacterium and has the greatest impact on reproductive female tract. Diagnose of the infection is impaired by the fact that most of the times the infection is asymptomatic. The polymerase chain reaction (PCR) test is more sensible than immunodetection tests, however, commercial tests are costly. Validation of an in-house PCR, on the other hand, requires stringent tests and expertise. **Objective:** Our aim was to study the application of an in-house PCR on endocervical specimens and compare the results with those obtained with commercial methods. **Methods:** Sixty-five samples from women referred to a private laboratory with a specific request for *C. trachomatis* test by ELISA or from a public health STD clinic were included in this study. The in-house PCR was compared with commercially available test, whose results were used to classify the samples as positive or negative, if both tests gave the same result for a particular sample. **Results:** The in-house PCR was able to detect 63% and 50% of the positive samples, as defined by ELISA/PCR Amplificor and direct immunofluorescence/PCR Amplificor, respectively. The best sensitivity was obtained by in-house nested PCR, followed by PCR Amplificor and in-house PCR with one log difference between each test. **Conclusion:** The application of the in-house PCR shows that is necessary to improve the detection system of amplification in order to make it more sensible. Also, expand the use of current test to other clinical specimens are important steps to be considered. In spite of the initial cost, to introduce this test is cheaper than using commercial tests.

**Keywords:** PCR polymerase chain reaction, *C. trachomatis*, endocervical specimens

ISSN: 0103-0465

DST – J bras Doenças Sex Transm 15(4):17-21, 2003

## INTRODUÇÃO

A infecção por *C. trachomatis* é uma das enfermidades de transmissão sexual mais freqüente em países desenvolvidos.

Nos Estados Unidos são estimados, anualmente, 3 milhões de casos novos da infecção entre adolescentes sexualmente ativos<sup>1</sup>. No Brasil, trabalhos recentes buscam estabelecer a prevalência da infecção em alguns grupos e não há medidas de prevenção da transmissão estabelecidas<sup>16</sup>.

Nas mulheres, a infecção pode trazer como consequência a doença inflamatória pélvica, infertilidade, gravidez ectópica, parto prematuro e morte neonatal. Em torno de 17% dos recém-nascidos de mães infectadas apresentam conjuntivite e cerca de 20% apresentam pneumonia<sup>2</sup>.

Uma característica importante desta infecção é o caráter assintomático, descrita em 50% dos homens e 70% das mulheres<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Doutora em Biologia da Comunicação Celular (Universidade de León)

<sup>2</sup> Médica Especialista em Patologia Clínica

<sup>3</sup> Bioquímica

<sup>4</sup> Doutor em Ciências Farmacêuticas (Universidade de Osaka)

<sup>5</sup> Doutora em Bioquímica (UFRGS)

<sup>1, 2, 3, 4</sup> Do Weinmann Laboratório, Porto Alegre, RS

<sup>1, 5</sup> Do Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (CDCT/FEPPS), Porto Alegre, RS

Indivíduos assintomáticos representam reservatórios crônicos do microrganismo e dificultam estudos epidemiológicos e a escolha de testes de detecção laboratorial que permitam a intervenção e controle da infecção. Há uma variedade de testes desenvolvidos para o diagnóstico da infecção tais como cultura, técnicas de amplificação de DNA, técnicas que utilizam sondas de DNA e testes de imunodeteção através da imunofluorescência direta (IFD) e enzimaímunoensaio (ELFA). A cultura celular é o método de referência (*gold standard*)<sup>3</sup>, tem especificidade próxima a 100%, mas apresenta dificuldades de padronização e necessidade de estrutura de laboratório onerosa. Os testes de imunodeteção são os mais utilizados no nosso meio, considerando a estrutura dos laboratórios de rotina clínica e custo dos testes comerciais. A implementação de uma técnica deveria basear-se na maior sensibilidade clínica, mas se admite o emprego de técnicas de triagem menos sensíveis, como os de imunodeteção, conhecendo-se a prevalência da infecção<sup>11</sup>. Neste caso, o laboratório deveria prever a necessidade de coletar nova amostra para os casos de resultados inconclusivos e submeter esta amostra a um teste mais sensível<sup>4</sup>.

A amplificação de DNA é o método de eleição por sua maior sensibilidade<sup>10</sup>, embora o custo do teste comercial seja proibitivo para a maioria dos laboratórios. Desenvolver um método de amplificação de DNA como a reação em cadeia da polimerase (*polymerase Chain Reaction* – PCR) é complexo e, contudo, uma proposta viável economicamente até mesmo com relação ao custo dos testes de imunodeteção.

Para avaliar adequadamente sensibilidade e especificidade, a agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) preconiza a comparação do novo teste com dois testes: um cultural e outro não-cultural<sup>3</sup>. O guia da prática clínica publicada pelo *Centers for Disease Control* (CDC) considera um diagnóstico definitivo quando a cultura para clamídia é positiva ou dois testes não culturais são simultaneamente positivos<sup>5</sup>. Os modelos de estudo mais recentes eliminaram a prática de realizar a análise de amostras discordantes porque esta superestima o método em análise<sup>11</sup>. O modelo proposto por Black *et al.*<sup>4</sup> (2002), utilizou *swab* endocervical e/ou uretral e urina de cada participante, permitindo classificar o indivíduo como infectado quando ambas as amostras foram positivas. De acordo com este modelo, os testes comerciais aprovados pelo FDA são adequados para comparação por serem padronizados, mesmo que sensibilidade e especificidade sejam imperfeitas. As variações interlaboratoriais encontradas nos resultados sugerem que até laboratórios com profissionais experientes podem apresentar desempenho inadequado, sendo necessária a participação em programas de proficiência como medida de segurança na liberação dos resultados. Este modelo é de alta complexidade e caro, como ressaltado no próprio texto, e expõe com clareza as dificuldades na obtenção de padrões de comparação<sup>4</sup>. O modelo adotado neste trabalho, embora não seja o modelo ideal, foi o proposto por Alonzo e Pepe<sup>1</sup> (1999), onde a positividade de uma amostra clínica para dois métodos de diagnóstico (comerciais) constitui um resultado verdadeiramente positivo para a infecção por clamídia, diminuindo as variações devidas aos resultados falsos positivos<sup>10</sup>.

O objetivo deste estudo foi aplicar a técnica da PCR *in house* na detecção de *C. trachomatis* em amostras endocervicais e comparar os resultados com os obtidos pela análise com métodos comerciais.

## MÉTODOS

### Seleção de amostras endocervicais

Um total de 65 amostras foi analisado. Parte das amostras (23) tinham solicitação médica de pesquisa de *C. trachomatis* por ELFA em laboratório privado da cidade de Porto Alegre. As outras amostras (42) eram provenientes de mulheres (de até 30 anos) atendidas em serviço de saúde pública dedicado a doenças sexualmente transmissíveis de Porto Alegre. A coleta das amostras fez-se com o consentimento prévio das pacientes. Estas foram interrogadas a respeito da idade, presença de sintomas e tratamento prévio (critério de exclusão).

As coletas foram realizadas pelos kits de coleta *STD-Swab Specimen Collection-Roche* e *CHL-Vidas Chlamydia female collection kit-VIDAS*<sup>®</sup> de acordo com a orientação dos fabricantes. Para a PCR *in house* utilizou-se o *CHL-Vidas Chlamydia female collection kit* com adição de 0,6 mL de tampão de fosfato de sódio pH 7,4 (PBS) a cada tubo de coleta. As amostras foram submetidas a dois processos de análise e comparação da PCR *in house* com: PCR-Amplicor-*C. trachomatis* Assay e ELFA (VIDAS<sup>®</sup> Chlamydia-CHL); PCR-Amplicor-*C. trachomatis* Assay e IFD (Chlamydia Direct IF).

### Preparo das amostras

As amostras coletadas para o teste ELFA e reutilizadas para a PCR *in house* foram tratadas como o proposto por Farrell *et al.* (1996)<sup>7</sup>: centrifugação (1.500 g/10 min), lavagem (2 x com PBS pH 7,2) e armazenamento em alíquotas de 500 µL a 4° C por até 7 dias.

O mesmo *swab* das amostras coletadas para o teste PCR-Amplicor foi utilizado na realização de um esfregaço em lâmina para proceder a IFD.

A extração de DNA para a PCR *in house* foi realizada com DNAzol<sup>TM</sup> Reagent (GIBCO BRL).

## Métodos

Os métodos comerciais foram realizados conforme indicações do fabricante.

A análise dos resultados utilizou os parâmetros: % de coincidência, % de detecção, % de sensibilidade<sup>8</sup>.

As amostras foram consideradas verdadeiramente positivas (VP) ou verdadeiramente negativas (VN) quando o resultado era coincidente para ELFA e PCR-Amplicor ou IFD e PCR-Amplicor.

### 1-Imunodeteção

A IFD (Chlamydia Direct IF-bioMérieux) avaliou simultaneamente a adequação da amostra e a presença de estruturas características (corpos de inclusão e corpos elementares-EB) de células infectadas por clamídia, utilizando anticorpos monoclonais fluorescentes (conjugado). A amostra deveria conter no mínimo 50

células epiteliais por campo microscópico (400 ×) conforme recomendação do CDC<sup>5</sup> na avaliação citológica periódica das amostras clínicas<sup>3</sup>.

O método de ELFA (VIDAS<sup>®</sup> Chlamydia-CHL bioMérieux) considera o resultado positivo quando superior a 80 RVF (valor de referência relativo) ou negativo quando inferior a 60. Um resultado entre 60 e 80 está na “zona cinza”, ou seja, é considerado inconclusivo e deve ser repetido. Se a reação inconclusiva persistir é sugerido repetir o teste por outra técnica. O tratamento da amostra inconclusiva com anticorpo bloqueador não foi realizado porque o reagente de neutralização estava indisponível.

## 2-Amplificação de DNA

A amplificação de DNA, na detecção da clamídia, é o método de eleição por sua maior sensibilidade<sup>10</sup>, especialmente quando dirigida ao plasmídeo que proporciona de 7 a 10 cópias de DNA por bactéria<sup>13</sup> e apresenta-se em 99% das linhagens<sup>11</sup>.

### 2.1-“PCR-Amplicor-*C. trachomatis* Assay” (Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J.)

Utiliza *primers* que amplificam uma seqüência plasmidial de 207 pb da *C. trachomatis*. A visualização da reação é realizada pela captura do *amplicon* gerado na reação por uma sonda específica aderida a uma microplaca. A cor produzida é quantificada pela leitura da densidade ótica e comparada aos parâmetros do protocolo.

### 2.2- PCR in house

Foi realizada de acordo com os protocolos e *primers* descritos por Lan *et al.*<sup>12</sup> (1993) com alterações nos parâmetros do método original quanto ao volume ao final da concentração MgCl<sub>2</sub> e temperatura de anelamento. O par de *primers* denominado CTP1/CTP2 amplifica uma seqüência plasmidial de 201 pb da *C. trachomatis*, cujo tamanho do fragmento é semelhante ao produzido pelo teste de PCR-Amplicor (207 pb) para favorecer a identificação pelo método de detecção visual.

A reação foi padronizada para um volume de 5 µL de amostra e volume final de 50 µL, submetidos a 40 ciclos de 1 min a 95° C para desnaturação, 1 min a 55° C para anelamento e 90s a 72° C para a elongação.

A detecção do produto da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. As amostras foram consideradas positivas quando apresentavam banda de 201 pb, comparável ao marcador de peso molecular na posição correspondente.

Foram ensaiados recursos como reamplificações com o mesmo par de *primers* e PCR-anidada que emprega dois pares de *primers* e duas amplificações consecutivas de 1 ciclo inicial de 5 min a 95° C para desnaturação do DNA, seguido de 34 ciclos de 1 min a 95° C (desnaturação), 1 min a 55° C (anelamento), 1 min a 72° C (elongação) e 5 min a 75° C para a extensão. Na 1ª amplificação, utilizou-se o par de *primers* CTP4/CTP5 (PCR *in house* 1) que permite amplificar uma região de 400 pb, na 2ª reação (PCR *in house* 2) o par de *primers* CTP1/CTP2 (1 µL da 1ª reação).

## 3 - Determinação do limite de detecção

O limite de detecção do número de cópias de DNA pelo método PCR *in house* foi determinado por meio de diluições seriadas do DNA extraído de cultura de células infectadas com *C. trachomatis* (serovares 1.555, 1.609 e 1.633) e comparadas ao PCR-Amplicor. Estas foram cedidas pelo Serviço de Referência da Universidade de Kawasaki, Okayama (Japão).

## RESULTADOS

### 1-Amostras analisadas pela PCR in house, ELFA e PCR-Amplicor

Foram selecionadas 22 amostras positivas e uma inconclusiva pelo resultado do ELFA e analisadas pela PCR-Amplicor e PCR *in house* (Tabela 1). Através do resultado do ELFA identificaram-se amostras com reação forte (RVF > 1.000), fraca (RVF > 80 e < 1.000) e inconclusiva (RVF > 60 e < 80). A amostra inconclusiva para o ELFA foi positiva para a PCR-Amplicor. 91% (20/22) das amostras foram positivas para os testes ELFA e PCR-Amplicor e 59% (13/22) para PCR *in house*. As amostras negativas para a PCR *in house* tinham reação fraca no ELFA com exceção de uma amostra.

A sensibilidade entre os testes PCR *in house* e PCR-Amplicor foi de 60% (12/20) e entre PCR *in house* e ELFA 59% (13/22). Classificaram-se como VP 19 amostras. A PCR *in house* detectou 63% (12/19) destas amostras VP.

### 2-Amostras analisadas pela PCR in house, IFD e PCR-Amplicor

Foram classificadas 36 amostras como VN e 4 como VP. 14,3% (6/42) das amostras foram positivas por um dos testes IFD ou PCR-Amplicor. A técnica da PCR *in house* foi positiva em 50% (3/6) das amostras positivas, houve uma coincidência de 75% (3/4) com PCR-Amplicor e detecção 50% (2/4) das amostras VP (Tabela 2).

Um procedimento de reamplificação em 37 de 42 amostras obteve 5 amostras positivas adicionais (incluindo as 3 positivas para o teste PCR-Amplicor). Neste caso a coincidência entre as PCR *in house* e PCR-Amplicor foi de 75% (6/8) e a PCR *in house* detectou 100% (6/6) das amostras positivas para a PCR-Amplicor.

O método da PCR *in house* aplicado a diluições de DNA extraído de cultura de células apresentou reação positiva até a diluição 10<sup>(-4)</sup> (Tabela 3) e a PCR-Amplicor e PCR *in house* 1 (1ª reação da PCR-anidada) foram positivos até a diluição 10<sup>(-5)</sup>. A PCR-anidada foi positiva até a diluição 10<sup>(-6)</sup>.

Resumindo, a ordenação dos métodos pelo grau de sensibilidade:

PCR *in house* < PCR *in house* 1 =  
PCR-Amplicor < PCR-anidada.

Tabela 1 - Comparação de resultados na detecção de *C. trachomatis*

Amostras de secreção endocervical	Resultados	Resultados da amplificação	
	ELFA	PCR <i>in house</i>	PCR-A
2(22)	pos.	neg.	neg.
8(22)	pos.	neg.	pos.
12(22)	pos.	pos.	pos.
Amostras de secreção endocervical verdadeiramente positivas			
12(19)	pos.	pos.	pos.

Tabela 2- Comparação de resultados na detecção de *C. trachomatis*

Amostras de secreção endocervical (VP e VN)*	Resultados	Resultados da amplificação	
	DFA PCR <i>in house</i>	PCR-A	
36(42)*	neg.	neg.	neg.
2(4)*	pos.	pos.	pos.
4(42)	pos.	neg.	pos.
2(42)	neg.	neg.	pos.
1(42)	neg.	neg.	pos.
1(42)	neg.	pos.	pos.

Tabela 3- Resultados obtidos para os método PCR *in house*/ Amplicor a partir de diluições de DNA

Diluição (serovar 1555, 1609, 1633)	PCR <i>in house</i>	PCR-Amplicor <sup>#</sup>
10 <sup>(-4)</sup>	pos.	3,028-1,110 (pos.)
10 <sup>(-5)</sup>	neg.	1,559-0,629 (pos.)
10 <sup>(-6)</sup>	neg.	0,160-0,149 (neg.)

# Teste comercial utilizado como método de comparação, seguindo as instruções do fabricante (teste negativo quando se obtém um valor de OD<sub>450</sub> inferior a 0,250).

## DISCUSSÃO

A maior dificuldade no diagnóstico da infecção por *Chlamydia trachomatis* é o caráter assintomático desta. A escolha da PCR na detecção da clamídia em amostras clínicas está fundamentada na maior sensibilidade e especificidade de métodos de biologia molecular frente aos métodos de imunodeteção<sup>3</sup>. Comparada ao isolamento do patógeno em cultivo celular, os métodos moleculares são mais rápidos, apresentam maior sensibilidade e especificidade semelhante<sup>11</sup> e não exigem cuidados de armazenamento para conservar a viabilidade das amostras<sup>3</sup>.

O número de amostras para verificação de novos testes, segundo Elder *et al.*<sup>6</sup> (1997), é de no mínimo 50 amostras VP e 100 VN. Se a sensibilidade e especificidade do teste em análise forem 5% inferiores com relação ao teste de comparação os ensaios devem ser repetidos, depois de tomadas medidas corretivas<sup>6</sup>. Neste trabalho utilizaram-se 23 amostras VP e 36 VN e recursos para melhorar a eficiência foram testados mesmo sem ter um nº de amostras considerada suficiente.

A determinação de coincidência, detecção e sensibilidade da PCR *in house*, com relação às amostras clínicas, empregou as técnicas de PCR-Amplicor, ELFA e/ou DFA.

As amostras analisadas pelos testes ELFA e PCR-Amplicor permitiram classificar 19 amostras VP e detecção de 63% pela PCR *in house*. A sensibilidade entre os testes PCR *in house* e PCR-Amplicor foi de 60%, entre PCR *in house* e ELFA 59% e PCR-Amplicor e ELFA 91%. Entre as amostras negativas para a PCR *in house*, apenas uma era fortemente positiva para o ELFA

(embora o ELFA seja um teste qualitativo). As amostras com reações fracas podem representar baixa infectividade da amostra clínica ou reações falsas positivas para ELFA. A falta da reação de neutralização dos testes positivos como é recomendado para os ensaios imunoenzimáticos<sup>11</sup>, pode explicar a maior positividade para o ELFA, contradizendo o que se sabe sobre a menor sensibilidade dos métodos de cultura e imunodeteção com relação às reações de PCR<sup>3</sup>. Além disso, o reaproveitamento de amostras para a PCR-Amplicor é provavelmente inadequado, pois o fabricante apresenta uma orientação clara sobre a forma de coleta. Outros fatores influenciam determinadamente nos métodos de diagnóstico microbiológico, independente da técnica que se utilize, da coleta da amostra clínica, do seu manuseio<sup>14</sup> e preparação que são diretamente relacionados com a sensibilidade<sup>10</sup>. Por outro lado, o estudo não visava a análise da sensibilidade dos testes comerciais e sim a obtenção de amostras VP para comparação dos resultados dos testes comerciais com o método PCR *in house*.

As amostras clínicas analisadas por IFD e PCR-Amplicor foram positivas em 9,5% e 14,3% respectivamente. Estes resultados eram esperados já que a PCR-Amplicor é mais sensível que a técnica IFD<sup>3</sup> e a correlação obtida é semelhante à encontrada em outro estudo<sup>17</sup>. O surpreendente com relação a estes resultados foi o baixo nº de amostras positivas, por procederem de um serviço de doenças sexualmente transmissíveis, onde o esperado, de acordo com a literatura, é uma positividade em torno de 25%<sup>2</sup>.

A PCR *in house* detectou 50% das amostras VP e o fato pode ser devido a: a) ocorrência de resultados falsos positivos para a

PCR-Amplicor ou o teste IFD não detectou todas amostras positivas. A 2ª hipótese é mais provável, já que houve concordância de resultados positivos entre as PCR *in house* e PCR-Amplicor que foram negativas para a IFD demonstrando que o padrão de referência adotado pode ser inadequado por omitir amostras VP; b) influência da conservação da amostra no resultado da PCR *in house*. Neste grupo as instruções de coleta do fabricante para a PCR-Amplicor foram respeitadas cuidadosamente. Entretanto, para a PCR *in house* não se analisou a adequação do material de coleta e, a intenção de alternar a ordem de coleta dos *swabs* não se concretizou (o 1º *swab* foi destinado a PCR-Amplicor).

A reamplificação não é recomendável para utilização na rotina de procedimentos de laboratório devido à possibilidade de intensificar a amplificação de fragmentos inespecíficos, inibições ou contaminações cruzadas entre as amostras<sup>15</sup>. No entanto, este procedimento demonstrou que havia DNA da clamídia em quantidade inferior ao limite de detecção do método da PCR *in house* em 5 amostras. A sensibilidade da reamplificação para as 4 amostras VP foi de 100% e, a coincidência de amostras positivas com o teste PCR-Amplicor foi de 83,3%. Os resultados indicam claramente que nas condições originais a PCR *in house* apresenta rendimento insuficiente para detectar amostras com um baixo grau de infecção. Embora o pequeno número de amostras não permita estimar a prevalência da infecção, a reamplificação elevou de 14,3% para 29,7% a frequência de amostras positivas. Seguindo a orientação de incluir controles positivos obtidos de cultura na implementação de testes de amplificação de DNA<sup>11</sup> a PCR *in house* foi aplicada a amostras de cultura celular de *C. trachomatis* produzindo o tamanho de fragmento esperado. Estas, em diluições seriadas, permitiram verificar a quantidade mínima de células infectadas que ainda produzem sinal de amplificação. Ensaios em paralelo compararam as sensibilidades do método da PCR *in house* e PCR-anidada com o teste comercial PCR-Amplicor. A sensibilidade da PCR *in house* foi de uma unidade logarítmica inferior ao teste PCR-Amplicor, o que equivale a cerca de 100 células de *C. trachomatis* ou 1.000 cópias de DNA. A sensibilidade da PCR-anidada foi de uma unidade logarítmica superior ao teste PCR-Amplicor.

A diferença de sensibilidade encontrada entre as PCR *in house* e PCR-Amplicor pode ser atribuída principalmente ao sistema de detecção do produto amplificado por hibridização com sondas biotiniladas para o método da PCR-Amplicor, contra a visualização em gel de agarose<sup>9</sup>. Os resultados indicam ser necessário investir em um método de detecção de amplificação mais sensível e eficiente, ampliar o número de amostras em outros grupos e utilizar outros tipos de amostras clínicas. As soluções sugeridas para alguns problemas encontrados aumentam o custo inicial na implementação da PCR *in house*, mas se compensa pelo custo ainda mais elevado dos testes comerciais (inclusive os de imunodeteção)<sup>16</sup>.

A melhor tecnologia pode não estar ao alcance de todos os laboratórios de patologia clínica e os riscos da má administração de limites do método e benefícios existem para todas as técnicas citadas (comerciais e não comerciais), por isso devem prevalecer a ética e o profissionalismo, considerando as conseqüências adversas da infecção e os aspectos psicossociais de um diagnóstico laboratorial equívoco.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONZO TA, AND PEPE MS. Using a combination of reference tests to assess the accuracy of a new diagnostic test. *Stat. Med.*, 18:2987-3003, 1999.
- BEAGLEY KW, TIMMS P. *Chlamydia trachomatis* infection: incidence, health costs and prospects for vaccine development. *J. Reproduc. Immunol.*, 48: 47-68, 2000.
- BLACK MC. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin. Microbiol.Rev.*, 10: 160-184, 1997.
- BLACK MC, MARRAZZO J, JOHNSON RE, HOOK EW, JONES RB, GREEN TA, SCHACHTER J, STAMM WE, BOLAN GST, LOUIS ME, MARTIN DH. Head-to-Head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J.Clin. Microbiol.*, 40:3757-3763, 2002.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections. *MMWR* 1993, 42(No.RR-12): 1-37.
- ELDER BL, HANSEN SAA, KELLOGG AJ, ZANBRANSKY MEJR. *Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory*. CUMITECH. ASM Press, Washington, 31: 1-18, 1997.
- FARRELL DJ, HARAN MV, PARK BW. Comparison of PCR/ nucleic acid hybridization and EIA for the detection of *Chlamydia trachomatis* in different populations in a regional center. *Pathol.*, 28: 74-79, 1996.
- FERREIRA AW, ÁVILA LMS. Sorologia: importância e parâmetros. In: *Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes*. Guanabara Koogan S.A.. Cap.,1: 1-8, 2001.
- HALLSWORTH GP, HEFFORD C, RUSSEL GW, GORDON DL. Comparison of antigen detection, polymerase chain reaction and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in genital infection. *Pathol.*, 27: 168-71, 1995.
- JOHNSON RE, GREEN TA, SCHACHTER J, JONES RB, HOOK EW, BLACK CM, MARTIN DH, ST LOUIS ME, STAMM WE. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 4382-4386, 2000.
- JOHNSON RE, NEWHALL JW, PAPP JR, KNAPP JS, BLACK CM, GIFT TL, STEECE R, MARKOWITZ LF, DEVINEO J, WALSH CM, GUNTER DC, IRWIN KL, LISLE S, BERMAN SM. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *MMWR* 2002, 51(No.RR-15): 1-38.
- LAN J, WALBOOMERS JMM, ROOSENDAL R, DOORNUM GJ, MACLAREN DM, MEIJER CJL, JBRULE AJC. Direct detection and genotyping of Ct in cervical scrapes by using PCR and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. PALMER*, FALKOW, S. A common plasmid of *Chlamydia trachomatis*. *Plasmid*, 16: 52-63, 1986.
- PERSING DH. Target selection and optimization of amplification reactions. In: *Diagnostics molecular microbiology principles and applications*. ASM, Washington, p.88-104, 1993.
- PETERSON EM, MARKOFF BA, SCHACHTER J, MAZA LM. The 7,5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. *Plasmid*. 23: 144-214, 1990.
- RAMOS M, BECKER D, GERMANY C, RITTER A, PERIN M, SANDER M, FILGUEIRAS A, CASTARI T. Prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria Gonorrhoeae* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em urina de gestantes adolescentes e mulheres atendidas em ambulatórios de ginecologia em hospital público em Porto Alegre, Brasil. *DST - J bras. Doenças Sex. Transm.*, 14(6):4-8, 2002.
- SEMENIUK H, ZENTNER A, READ R, CHURCH D. Evaluation of sequential testing strategies using non-amplified and amplified methods for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical and urine specimens from women. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 42: 43-59, 2002.

### Endereço para Correspondência

**CLAUDETE FARINA SEADI**

Setor de Imunologia – Weinmann Laboratório

nº 910 / 5º andar – Porto Alegre, RS - CEP: 90035-001

e-mail: cseadi@weinmann.com/Weinmann@zaz.com.br

Recebido em: 27/11/03

Aprovado em: 20/12/03