

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Curso de Graduação em Farmácia

**JAQUELINE DA SILVEIRA**

**Padronização de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de *Trichomonas vaginalis* em amostras de urina.**

Florianópolis

2018

JAQUELINE DA SILVEIRA

**Padronização de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção de *Trichomonas vaginalis* em amostras de urina.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Bazzo

Coorientadora: Dr<sup>a</sup> Ana Paula Pessoa Vilela

Florianópolis

2018

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, Alzira e Jose,  
pelo amor, apoio e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me concebido forças necessárias para superar todas as dificuldades impostas a mim.

Aos meus pais, que fizeram toda a diferença e apoiaram as minhas escolhas, pelo amor, carinho, dedicação e principalmente incentivo para realizar esta conquista.

Ao meu namorado Giovani Reinert Junior pelo amor, carinho, paciência e, principalmente apoio, por estar presente para enxugar as lágrimas que deixei cair durante os momentos mais difíceis dessa caminhada.

A professora Dra. Karin Silva Caumo pelos conhecimentos repassados com maestria, os quais foram de grande importância para minha formação e por me apresentar a área da pesquisa, a qual me apaixonei.

A professora orientadora Dra. Maria Luiza Bazzo pela oportunidade oferecida, pelos conhecimentos repassados com maestria, pela orientação e pelo exemplo de profissionalismo.

Aco-orientadora Dra. Ana Paula Pessoa Vilela que me acompanhou diariamente no laboratório, que contribuiu com os conhecimentos fundamentais para a evolução do trabalho e para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

A professora Dra. Tiana Tasca por fornecer as culturas tão importantes para iniciarmos essa pesquisa na região de Santa Catarina.

A todas as minhas colegas do Laboratório de Estudos de Patógenos Emergentes e Oportunistas (LAPEO) por me aceitarem na equipe e por me acolherem. Com todas aprendi muito, agradeço por me ouvirem.

A minhas amigas, Juliana, Luiza e Mônica, por estarem presentes nos meus momentos dramáticos, por me escutarem e me apoiarem sempre que precisei.

Por fim, agradeço a todos que compreenderam as ausências, compartilharam de lágrimas e sorrisos. Família, colegas e amigos com vocês divido esta conquista.

## RESUMO

A tricomoníase é uma infecção sexualmente transmissível (IST) de grande importância mundial causada pelo protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis*. Possui prevalência igual ou superior à prevalência combinada dos agentes bacterianos mais comuns de ISTs, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. No Brasil, a prevalência da tricomoníase é variada, apresentando valores de 3,2-13,9%, e a infecção possui uma clínica muitas vezes inespecífica, podendo ser confundida com outras ISTs. Cerca de 50-80% dos pacientes são assintomáticos, requerendo métodos diagnósticos com alta sensibilidade e especificidade. Pode-se classificar o diagnóstico da tricomoníase em quatro métodos: microscopia a fresco, cultura, detecção de antígeno e testes de amplificação de ácido nucleico. Além desses métodos o diagnóstico pode ser realizado pelo encontro fortuito do protozoário na microscopia do parcial de urina. O Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas em ISTs do Ministério da Saúde recomenda a microscopia a fresco ou microscopia com coloração indicando que a primeira possui alta especificidade (100%) e baixa sensibilidade (44%). O teste exige microscópio no local de coleta de amostra e profissional treinado já que se baseia no movimento do protozoário que pode morrer durante transporte. Sendo assim, resultados negativos na microscopia não podem excluir a presença de *T. vaginalis* o que torna necessária a utilização de métodos mais sensíveis ou métodos capazes de identificar o protozoário sem movimento. Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo padronizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para detecção de *T. vaginalis* em amostras de urina. Selecionou-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) descrito na literatura que demonstrou bons resultados de sensibilidade e especificidade, além disso, foi realizado o desenho de oligonucleotídeos iniciadores, a fim de utilizá-los em PCR multiplex. Utilizou-se amostras de cultura ATCC 30236 para a realização da padronização com o intuito de obter-se o fragmento purificado para a realização da clonagem de DNA. Anterior à clonagem, foram utilizadas amostras de urina positivas para *T. vaginalis* para a padronização da reação com amostras biológicas, já que os resultados da PCR não apresentavam fragmento único de acordo com tamanho de fragmento esperado. Como resultados, foi possível verificar produtos de amplificação da PCR com tamanhos correspondentes aos descritos na literatura tanto em amostras de cultura como em amostras de urina, porém devido ao tempo reduzido para a realização deste trabalho e a clonagem tardia do fragmento específico de *T. vaginalis*, a padronização da PCR com amostras biológicas será realizada, posteriormente, assim como a os testes de sensibilidade e especificidade da PCR, para ampliar os recursos diagnósticos no laboratório de análise clínicas do HU/UFSC.

Palavras-chave: *Trichomonas vaginalis*; diagnóstico; urina; PCR.

## ABSTRACT

Trichomoniasis is a sexually transmitted infection (STI) of major worldwide importance caused by the flagellate protozoan *Trichomonas vaginalis*. It has a prevalence equal to or greater than the combined prevalence of the most common bacterial agents of STIs, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. In Brazil, the prevalence of trichomoniasis is varied, presenting values of 3.2-13.9%, and the infection has a clinic that is often non-specific and may be confused with other STIs. About 50-80% of the patients are asymptomatic, requiring diagnostic methods with high sensitivity and specificity. The diagnosis of trichomoniasis can be classified into four methods: fresh microscopy, culture, antigen detection and nucleic acid amplification tests. In addition to these methods the diagnosis can be performed by the fortuitous encounter of the protozoan in the microscopy of the partial of urine. The Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines on STIs of the Ministry of Health recommends fresh microscopy or stained microscopy indicating that the former has high specificity (100%) and low sensitivity (44%). The test requires a microscope at the sample collection site and a trained professional as it is based on the movement of the protozoa that may die during transport. Therefore, negative results on microscopy can not exclude the presence of *T. vaginalis*, which makes it necessary to use more sensitive methods or methods capable of identifying the protozoan without movement. In this context, the present work aimed to standardize a conventional polymerase chain reaction (PCR) for detection and *T. vaginalis* in urine samples. An initiator (primer) oligonucleotide described in the literature was selected which showed good results of sensitivity and specificity, in addition, the design of oligonucleotide primers was carried out in order to use them in multiplex PCR. ATCC 30236 culture samples were used for the standardization in order to obtain the purified fragment for the accomplishment of DNA cloning. Prior to cloning, *T. vaginalis* positive urine samples were used for the standardization of the reaction with biological samples, since PCR results did not present a single fragment according to expected fragment size. As results, it was possible to verify PCR amplification products with sizes corresponding to those described in the literature both in culture samples and in urine samples, however due to the reduced time to perform this work and the late cloning of the specific fragment of *T. vaginalis*, standardization of PCR with biological samples will be performed later, as well as PCR sensitivity and specificity tests, to broaden the diagnostic resources in the HU / UFSC clinical analysis laboratory.

Keywords: *Trichomonas vaginalis*; diagnosis; urine; PCR.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Formas celulares <i>T. vaginalis</i> .....	15
Figura 2: Trofozoítos de <i>T. vaginalis</i> .....	16
Figura 3: Ciclo de vida <i>T. vaginalis</i> .....	16
Figura 4: Sistema InPouch TV™ .....	20
Figura 5: Desenho esquemático da enzima de restrição .....	25
Figura 6: Desenho esquemático do processo de transformação .....	26
Figura 7: Fluxograma de atividades .....	30
Figura 8: Razão molar para determinação do volume de produto da PCR .....	36
Figura 9: Representação esquemática do plasmídeo pGEM-T easy vector .....	38
Figura 10: Fotografia do gel de agarose dos produtos da PCR para beta-globina .....	40
Figura 11: Fotografia do gel de agarose dos produtos dos protocolos A e B realizados com DNA obtido de de cultura de <i>Trichomonas vaginalis</i> . .....	43
Figura 12: Fotografia do gel de agarose dos produtos dos protocolos C – E realizados para DNA obtido de cultura de <i>Trichomonas vaginalis</i> . .....	45
Figura 13: Fotografia do gel de agarose dos produtos dos protocolos F e G realizados para DNA obtido de cultura de <i>Trichomonas vaginalis</i> . .....	46
Figura 14: Fotografia do gel de agarose dos produtos dos protocolos A – D realizados para DNA obtido de amostras de urina. ....	49
Figura 15: Fotografia do gel de agarose dos produtos da purificação .....	51
Figura 16: Fotografia do gel de agarose do fragmento de DNA clonado.....	58

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Sensibilidade e especificidades dos métodos diagnósticos para tricomoníase.....	22
Quadro 3: Protocolo para reação de ligação .....	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos iniciadores selecionados para amplificação do DNA de <i>T.vaginalis</i> e controle interno das reações de PCR. ....	33
Tabela 2: Protocolos para detecção de <i>T. vaginalis</i> utilizados como base para padronização. ....	33
Tabela 3: Quantificação de DNA por espectrofotômetro. ....	42
Tabela 4: Diferença nos volumes dos constituintes básicos e condições da PCR entre o protocolo de Crucitti et. al. (2003) e as modificações testadas neste estudo para amostras de cultura. ....	42
Tabela 5: Volumes dos constituintes básicos e condições da PCR estados no laboratório para DNA obtido de cultura de <i>Trichomonas vaginalis</i> . ....	46
Tabela 6: Diferença nos volumes dos constituintes básicos e condições de PCR entre o protocolo de Crucitti et. al. (2003) e os testados no laboratório para DNA obtido de amostras de urina. ....	48
Tabela 7: Quantificação das amostras purificadas por espectrofotômetro. ....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention (Centros de Controle e Prevenção de Doenças)
DNA	Ácido dextrirribonucleico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i> (Vírus Herpes Simples)
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i> (Vírus do Papiloma Humano)
IST	Infecção sexualmente transmissível
Meio LB	Meio Luria-Bertani
<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NAATS	Nucleic Acid Amplification Test (Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
<i>T. vaginalis</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>
Tm	Primer Melting Temperature (Temperatura de hibridização do <i>primer</i> )
TMA	Transcription Mediated Amplification (Amplificação Mediada por Transmissão)
TV	<i>Trichomonas vaginalis</i>
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 TRICOMONÍASE .....	13
1.2 PADRONIZAÇÃO DE PCR E CLONAGEM MOLECULAR .....	23
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	29
3.1 OBJETIVO GERAL .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	30
4.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR .....	30
4.1.1 <b>Desenho experimental</b> .....	30
4.1.2 <b>Obtenção de amostra de DNA de referência</b> .....	30
4.1.3 <b>Estabelecimento do melhor <i>kit</i> de extração para amostras de urina</b> .....	31
4.1.4 <b>Seleção e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores</b> .....	31
4.1.5 <b>Reação de PCR</b> .....	33
4.2 CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DE CONTROLES POSITIVOS PARA <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	35
4.2.1 <b>Ligação do fragmento purificado ao <i>pGEM T-Easy Vector System</i> – Formação do DNA recombinante (inserto)</b> .....	35
4.2.2 <b>Transformação e purificação do DNA plasmidial</b> .....	36
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
5.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR .....	40
5.1.1 <b>Extração de DNA para padronização</b> .....	40
5.1.2 <b>Padronização de PCR com amostras de cultura</b> .....	42
5.1.3 <b>Padronização da PCR com amostras biológicas</b> .....	47
5.2 CLONAGEM MOLECULAR .....	51
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	60
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62
<b>ANEXO A - Reagentes necessários para preparação das soluções de lise alcalina</b> .....	69

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) estão entre as infecções mais comuns em adultos e jovens. Existem mais de 30 agentes patogênicos bacterianos, virais e parasitários que podem ser transmitidos sexualmente. Se não tratados, alguns deles podem levar a complicações e sequelas (WHO, 2005). Dos oito patógenos transmitidos através de contato sexual e ligados à maior incidência de infecções, quatro, atualmente, são curáveis (sífilis, gonorreia, clamídia e tricomoníase) e quatro de difícil tratamento (os agentes patogênicos virais hepatite B crônica, herpes simples 1 e 2 [HSV-1 e HSV-2], HIV e papilomavírus humano [HPV]) (WHO, 2015).

Newman e colaboradores (2015) estimaram que exista, aproximadamente, 357 milhões de novas ISTs por ano, sendo que, tricomoníase e infecção por *Chlamydia trachomatis* representam a maior parte dos casos, 143,0 e 131,0 milhões, respectivamente. Porém, a infecção por *Neisseria gonorrhoeae* também é significativa, com aproximadamente 78,0 milhões de novos casos por ano.

### 1.1 TRICOMONÍASE

A tricomoníase está entre as cinco principais infecções parasitárias descritas como negligenciada nos Estados Unidos. Por ser uma infecção não reportada e possuir muitos casos assintomáticos, a sua epidemiologia pode estar subestimada (COLEMAN; GAYDOS; WITTER, 2013; CDC, 2017).

No Brasil, a epidemiologia da tricomoníase é estimada a partir de estudos locais já que não se trata de uma IST de notificação compulsória, sendo necessárias mais pesquisas ou estudo nacional de prevalência para entender a relevância epidemiológica dos casos. Os estudos locais apontam uma prevalência variável, que pode estar relacionada com características como o tipo de estudo realizado, tipos de métodos diagnósticos empregados no estudo, acesso a saneamento, escolaridade, comportamento sexual e idade dos participantes das pesquisas (AMBROZIO et al., 2016). Pode-se observar prevalência de 10,5% no município de Vitória de Santo Antão, Pernambuco (LIMA et al., 2013), 9% no Rio Grande do Sul (AMBROZIO et al., 2016), 5,7% e 2,6% no município de Uberlândia em Minas Gerais (GRAMA et al., 2010; GRAMA et al., 2013), 3,57% no estado de Sergipe (ALMEIDA et al., 2010), 3,2% na

região central de São Paulo (LUPPI et al., 2011), 4,1% no Amazonas em estudo que avaliou população vivendo com HIV (SILVA et al., 2013), 8,9% e 13,9% em Goiânia, Goiás, sendo este último dado também relacionada à pessoas vivendo com HIV (LEMONS; GARCIA-ZAP, 2010).

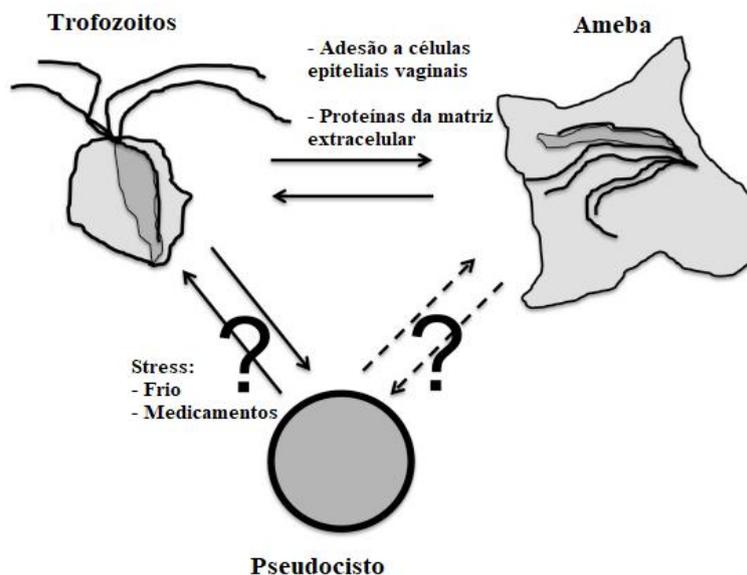
Embora as infecções sexualmente transmissíveis sejam curáveis na sua maioria, a alta incidência, prevalência e o aumento da resistência ao tratamento, bem como a associação com complicações de saúde, têm despertado preocupação para esses agravos (SECOR et al., 2014). Essas estimativas destacam a necessidade de intervenções efetivas de saúde pública para a prevenção, rastreamento, diagnóstico e tratamento das ISTs (NEWMAN et al., 2015).

A tricomoníase tem como agente etiológico o protozoário flagelado *Trichomonas vaginalis*, que foi primeiramente descrito por Alfred François Donné em 1836, a partir de um corrimento vaginal (DONNÉ, 1836). Os seres humanos são os únicos hospedeiros naturais de *T. vaginalis*. O protozoário infecta as células escamosas do trato genital feminino inferior, da uretra masculina e próstata (ŠOBA; SKVARČ; MATIČIČ, 2015). A transmissão da tricomoníase ocorre, principalmente, através do contato sexual, porém há casos de transmissão vertical por meio da contaminação vulvovaginal direta durante o parto ou pela ingestão de secreções maternas (COLEMAN; GAYDOS; WITTER, 2013). Outra forma de transmissão relatada é por meio de fômites, entretanto, são casos de difícil comprovação já que a exclusão do contato sexual depende dos relatos espontâneos dos indivíduos envolvidos. Porém, esse tipo de transmissão não pode ser descartada já que estudos comprovam que *T. vaginalis* pode sobreviver por até 3 horas fora do organismo humano (EDWARDS et al., 2014; KRIEGER, H.; KIMMING, P., 2015).

*T. vaginalis* possui uma forma amplamente descrita no seu ciclo de vida, porém revisões bibliográficas apontam que existem outras formas importantes. A forma mais caracterizada e considerada a forma infecciosa é a de trofozoíto, uma célula flagelada, piriforme e que apresenta movimentos cambaleantes. A segunda forma celular é a amebóide, caracterizada por aumento importante na superfície de contato com o epitélio infectado; esta forma é observada quando os trofozoítos entram em contato com as células epiteliais da vagina, do colo do útero, da uretra ou da próstata (HIRT, 2013; EDWARDS et al., 2014). Uma terceira forma celular chamada pseudocisto pode ser induzida *in vitro* após a exposição de trofozoítos a estressores (PEREIRA-NEVES; RIBEIRO; BENCHIMOL, 2003). Os gatilhos e a sinalização celular que comanda as

transformações das diferentes formas de *T. vaginalis* exemplificados na figura 1 ainda não foram completamente desfinidas. (HIRT et al., 2011; PEREIRA-NEVES; RIBEIRO; BENCHIMOL, 2003).

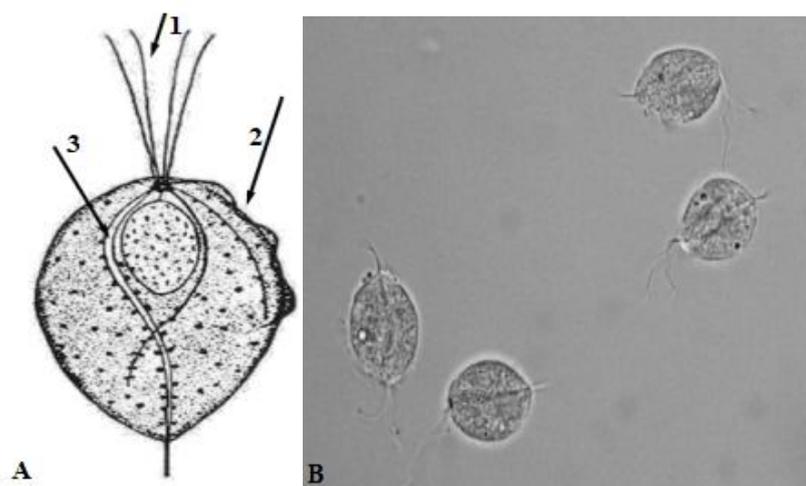
Figura 1: Formas celulares *T. vaginalis*



Fonte: Adaptado de Hirt. (2013).

Os trofozoítos medem de 10-20  $\mu\text{m}$  de comprimento e de 2-14  $\mu\text{m}$  de largura. Quatro flagelos se projetam da porção anterior da célula e um flagelo se estende para trás até o meio do organismo, formando uma membrana ondulada. O axóstilo se estende do aspecto posterior do microrganismo, tendo função na fixação celular e mitose (Figura 2). O ciclo de vida de *T. vaginalis* é simples, pois o protozoário tem como único hospedeiro os seres humanos e a sua multiplicação é por divisão binária longitudinal, exemplificado na figura 3. (KISSINGER, 2015; EDWARDS et al., 2014; RIBEIRO, MONTEIRO-LEAL, BENCHIMOL, 2000).

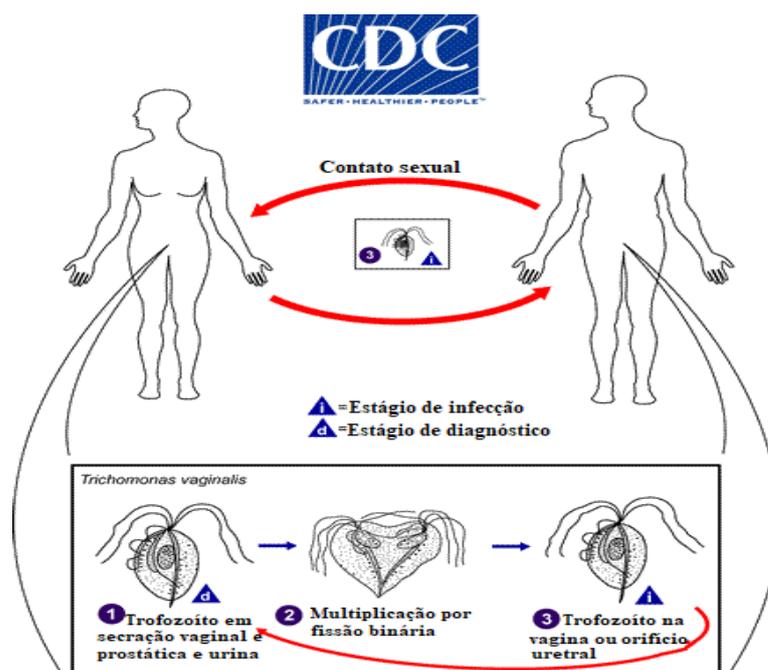
Figura 2: Trofozoítos de *T. vaginalis*



Legenda: A: Desenho esquemático de *T. vaginalis*; Seta 1, flagelos; Seta 2, membrana ondulante; Seta 3, axóstilo. B: *T. vaginalis* em microscopia a fresco. Fonte: Adaptado de Lemos; Garcia-Zap (2010) e Šoba; Skvarč; Matičič (2015).

A infecção, uma vez estabelecida, tem um período de incubação de 4 a 28 dias, em cerca de 50% dos indivíduos, e geralmente persiste por longos períodos nas mulheres, mas apenas por um curto período nos homens. De acordo com a gravidade, a tricomoníase pode ser classificada como sintomática aguda ou crônica e assintomática. (PETRIN et al., 1998)

Figura 3: Ciclo de vida *T. vaginalis*



Fonte: Adaptado de CDC (2017). Disponível em <https://www.cdc.gov/dpdx/trichomoniasis/index.html>

Estudos demonstram que aproximadamente 50-80% das infecções por *T. vaginalis* são assintomáticas (POOLE; MCCLELLAND, 2013; WHO, 2013). Quando sintomática a tricomoníase apresenta sinais e sintomas semelhantes aos causados por outras ISTs e vaginose bacterianas. Em mulheres, as apresentações clínicas podem variar de vaginite leve a grave, caracterizada por secreção difusa, fétida, amarelo-esverdeada com ou sem irritação vulvar ou uretrite caracterizada por disúria. Na cervicite a presença de hemorragias petequiais na ectocérvice (o chamado "colo do morango") pode distinguir a tricomoníase de outras causas de cervicite, mas isso não é frequentemente identificado. Em homens podem causar epididimite, prostatite e uretrite caracterizada por secreção uretral e disúria (CDC, 2015; HOBBS; SEÑA, 2013).

A infecção por *T. vaginalis*, assim como outras ISTs, pode levar a complicações graves. Estudos demonstram que a tricomoníase está associada à doença inflamatória pélvica, (MOODLEY et al., 2002; GRODSTEIN; GOLDMAN; CRAMER, 1993). Também está relacionada com problemas durante a gravidez, como ruptura prematura de membrana amniótica, parto prematuro e o recém-nascido pode apresentar baixo peso ao nascer (SILVER et al., 2014; MEITES, 2013). Ainda, a tricomoníase vem sendo apontada como um fator de risco na aquisição de outras infecções sexualmente transmissíveis, como herpes-vírus simples 1 e 2 (HSV-1, HSV-2), sífilis e HIV (ALLSWORTH; RATNER; PEIPERT, 2009).

A relação entre a infecção por *T. vaginalis* e a infecção por HIV está sendo amplamente descrita, os estudos apontam que a tricomoníase pode aumentar em 2 a 3 vezes o risco de se adquirir HIV (CDC, 2015; GUENTHNER; SECOR; DEZZUTTI, 2005). A maior susceptibilidade é biologicamente possível, pois a infecção pelo protozoário danifica o revestimento epitelial, a principal barreira protetora mecânica contra patógenos, permitindo o acesso do HIV. Ocorre também um processo inflamatório agressivo nas células do epitélio da vagina e da uretra com o recrutamento de células de defesa, resultando no aumento de células-alvo para o vírus. A infecção por *T. vaginalis* também leva a alterações na microbiota e pH dos órgãos reprodutores, produzindo um ambiente favorável para que o HIV possa infectar as células do sistema

imunológico do hospedeiro (KISSINGER, 2015; GUENTHNER; SECOR; DEZZUTTI, 2005).

Devido à gravidade da evolução da infecção por *T. vaginalis*, e por suas manifestações clínicas serem muitas vezes inespecíficas e assintomáticas, o diagnóstico de *T. vaginalis* deve ser considerado sempre que se pesquisa uma IST e para isso são necessários métodos com alta sensibilidade e especificidade, e de fácil realização (HOBBS; SEÑA, 2013). Pode-se classificar o diagnóstico de tricomoníase em quatro ensaios laboratoriais: microscopia a fresco com ou sem corantes, cultura, detecção de antígeno e testes de amplificação de ácido nucleico (NAATs) (WHO, 2013). A sensibilidade e especificidade desses métodos variam de acordo com o princípio do método. Os principais métodos estão apresentados a seguir e resumidamente na tabela 1 da página 19.

O exame microscópico a fresco é o método mais utilizado no diagnóstico da tricomoníase no mundo, embora seja um teste barato, simples e rápido, que oferece um diagnóstico em poucas horas, esse método possui baixa sensibilidade (44 a 79%) dentre as opções para o diagnóstico (HOBBS; SEÑA, 2013; MEITES et al., 2015). O material vaginal ou uretral é coletado utilizando swabs. Imediatamente após a coleta, o material deve ser colocado em solução salina estéril à temperatura ambiente e uma lâmina deve ser preparada com uma gota desta salina. A observação direta do protozoário em forma de pera ou arredondada apresentando sua principal característica de motilidade espasmódica ou cambaleante é considerada 100% específica (HOBBS; SEÑA, 2013; WHO, 2013; A STONER et al., 2013). A mesma amostra vaginal ou uretral, coletado pode ser utilizada para confecção de esfregaço, com posterior coloração (HOBBS; SEÑA, 2013).

A microscopia deve ser imediata, preparada e lida, dentro de 10 minutos, já que esses protozoários perdem mobilidade muito rapidamente. Atrasos, como por exemplo 10-30 minutos, entre a coleta de espécimes e o exame microscópico podem reduzir drasticamente a sensibilidade do teste (A KINGSTON; BANSAL; CARLIN, 2003). Outros interferentes que pode reduzir a sensibilidade do teste é o armazenamento e a temperatura durante o transporte da amostra até que seja lida, isso ocorre principalmente com temperaturas abaixo de 22°C (HOBBS; SEÑA, 2013). Os resultados negativos devem ser interpretados com cautela, não devem excluir uma infecção principalmente nos casos de infecção sintomática (WHO, 2013).

No Brasil, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas em ISTs do Ministério da Saúde recomenda que o diagnóstico de *T. vaginalis* deve ser por meio da visualização dos protozoários móveis em material do ectocérvice, por exame a fresco ou através da observação das características morfológicas do protozoário pela coloração de Gram, Giemsa, Papanicolaou, entre outras (BRASIL, 2015).

Existem situações em que o diagnóstico da tricomoníase ocorre durante a análise do sedimento urinário. Nessas situações, os protozoários são encontrados acidentalmente, ou seja, quando há a requisição para diagnóstico de *T. vaginalis* as amostras de urina não são uma opção para a realização do exame, mesmo que consideradas amostras não invasivas (HOBBS; SEÑA, 2013).

A cultura é considerada o padrão-ouro no diagnóstico de tricomoníase, proporciona sensibilidade entre 72-94%, sendo importante ressaltar que a melhor sensibilidade do método dá-se em paciente sintomático. (COLEMAN; GAYDOS; WITTER, 2013). O método necessita de 2 a 7 dias de incubação a 37°C e possui custo elevado quando comparado à microscopia a fresco, dificultando a aceitabilidade na rotina laboratorial, porém a cultura é usualmente empregada em laboratórios de pesquisas científicas. (PETRIN et al., 1998; HOBBS; SEÑA, 2013). As técnicas de cultura incluem o uso dos meios: Diamond modificado, Trichosel ou o sistema InPouch TV™ (HOBBS; SEÑA, 2013; LEMOS; GARCIA-ZAPATA, 2014).

O sistema InPouch TV™ é um dispositivo que permite o crescimento simultâneo, transporte e a observação do protozoário no mesmo produto. O sistema consiste em uma bolsa de plástico transparente, com duas câmaras em forma de V conectadas por uma passagem estreita. A bolsa permite a inoculação fácil da amostra com observação imediata, sem a necessidade de fazer uma montagem em lâmina/lamínula, armazenamento e/ou transporte antes de transferir para o laboratório para incubação e registro (BORCHARDT; SMITH, 1991).

Figura 4: Sistema InPouch TV™



Fonte:<[https://catalog.hardydiagnostics.com/cp\\_prod/product/CatNav.aspx?oid=8383&prodoid=142205](https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/product/CatNav.aspx?oid=8383&prodoid=142205)>

Os métodos de detecção de antígeno incluem os princípios de aglutinação, fixação de complemento, hemaglutinação indireta, difusão em gel, anticorpo fluorescente e ensaio imunoenzimático, em sua maioria são métodos de difícil realização devido a custos, dificuldade de obtenção de antígenos e antissoros (PETRIN et al., 1998). Considerando métodos mais aplicáveis à realidade diagnóstica atual existem dois produtos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration/EUA*) e comercializado nos Estados Unidos que utilizam princípios diferentes, são eles: OSOM™ *Trichomonas Rapid Test* (Sekisui Diagnostics, California, USA) que utiliza princípio de imunocromatografia de fluxo lateral; e o Affirm™ VPIII (Becton Dickinson, Maryland, EUA), que tem como princípio a hibridação de ácido nucleico não amplificado (HOBBS; SEÑA, 2013). Tanto no OSOM (Sekisui Diagnostics, California, USA) quanto no Affirm™ VPIII (Becton Dickinson, Maryland, EUA), as amostras são avaliadas no momento da coleta. Ambos os métodos proporcionam liberação dos resultados em 1 hora ou menos. A sensibilidade dos métodos de detecção de antígenos varia de 55-99% e possuem especificidade de 92-100%, porém, são todos destinados para uso com esfregaços vaginais de mulheres e nenhum desses testes foi

avaliado para diagnóstico de tricomoníase em homens (HOBBS; SEÑA, 2013; COLEMAN; GAYDOS; WITTER, 2013).

Os métodos de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs), assim como para outras ISTs, são considerados ferramentas atuais para o diagnóstico de infecções. Os NAATs incluem métodos como PCR (reação em cadeia da polimerase) e TMA (amplificação mediada por transmissão). Embora ainda não sejam considerados padrão-ouro, à medida que as técnicas moleculares se aprimoram na escolha dos oligonucleotídeos iniciadores e de boas polimerases, esses testes começam a apresentar alta sensibilidade (76-100%) e especificidade de (96-100%) (HOBBS; SEÑA, 2013; CRUCITTI, 2003). As PCRs são caracterizadas pela replicação e amplificação de milhões de cadeias de sequências de DNA ou RNA individuais específicas, sendo possível detectar a presença do microrganismo não viável. Detectar microrganismos não viáveis pode ser um problema na maioria dos casos, no entanto, para o diagnóstico de *T. vaginalis* a detecção por PCR do DNA do protozoário já sem movimento favorece o diagnóstico de amostras coletadas longe do ponto de realização do teste. Assim, a sensibilidade é maior do que os demais ensaios que detectam o microrganismo viável em movimento (microscopia a fresco e cultura) ou seus constituintes (detecção de antígeno). (HOBBS; SEÑA, 2013; PETRIN et al., 1998).

A possibilidade de detectar microrganismos não viáveis reflete no armazenamento e processamento das amostras, pois permite uma faixa mais ampla de temperatura e intervalo de tempo entre a coleta e a análise, melhorando a sensibilidade do diagnóstico. (HOBBS; SEÑA, 2013). Outra vantagem observada nesse método é a possibilidade de diagnosticar outras IST's na mesma amostra, por exemplo, a presença de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*, que tipicamente infectam o endocérvix e são facilmente detectadas em amostras endocervicais ou vaginais (TAYOUN et al., 2015; RUMYANTSEVA et al., 2015).

Mais uma vantagem observada quanto ao uso do diagnóstico de *T. vaginalis* por PCR é que também pode-se utilizar amostras não-invasivas, como por exemplo, amostras de urina. Estudos já demonstraram que amostras de urina são uma opção interessante para o diagnóstico de tricomoníase. (LÓPEZ-MONTEON et al., 2013; KAZEMI et al., 2004; LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000). Amostras de urina são de fácil coleta, já que o próprio paciente pode realizar a coleta, facilitam a investigação da tricomoníase em adolescentes e assim como amostras endocervicais,

podem ser utilizadas no diagnóstico de outras IST's por ensaios que detectam múltiplos patógenos (multiplex)(TAYOUN et al., 2015; BANDEA et al., 2013).

As técnicas padronizadas *in house* de PCR-convencional ou multiplex são amplamente descritas e validadas nos laboratórios para a pesquisa de *T. vaginalis* em amostra de mulheres e homens (YAR et al., 2017; TAYOUN et al., 2015; LÓPEZ-MONTEON et al., 2013; CRUCITTI, 2003; LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000). A sensibilidade analítica desses métodos é variável, já que não são utilizados os mesmos oligonucleotídeos iniciadores e polimerases, observando-se 76-100% de sensibilidade e 96-100% de especificidade, sendo que, os valores são comparados com cultura e microscopia a fresco (HOBBS; SEÑA, 2013). A padronização permite que o laboratório adeque o diagnóstico aos recursos disponíveis, assim como a rotina laboratorial, de modo a evitar o aparecimento de problemas de execução (OLIVEIRA, 2007).

O ensaio APTIMA *T. vaginalis* (Hologic Gen-Probe, San Diego, CA) foi aprovado pela FDA, em 2011, para a detecção do protozoário a partir de amostras vaginais, endocervicais ou de urina de mulheres, podendo ser modificado para realização em amostras masculinas (CDC, 2015). Este ensaio detecta RNA por TMA e requer equipamento específico de alta complexidade e pessoal treinado. O ensaio apresenta sensibilidade de 88-100% e especificidade de 98-100%, porém possui custo elevado quando comparado à microscopia a fresco e não é realizado na maioria dos locais de atendimento das mulheres. (HOBBS; SEÑA, 2013; COLEMAN; GAYDOS; WITTER, 2013).

Quadro 1: Sensibilidade e especificidades dos métodos diagnósticos para tricomoníase

<b>Método</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>
Microscopia a fresco	44-79%	100%
Cultura	44-94%	100%
Detecção de antígenos	55-99%	92-100%
PCR comercial	88-100%	98-100%
PCR <i>inhouse</i>	76-100%	96-100%

Fonte: Adaptado de COLEMAN; GAYDOS; WITTER, 2013 e HOBBS; SEÑA, 2013

O tratamento da tricomoníase reduz os sinais, sintomas e a transmissão. A classe dos nitroimidazóis é a única classe de antimicrobianos conhecidos eficazes contra a infecção por *T. vaginalis*. A posologia recomendada pelo CDC é o uso de metronidazol 2g via oral em dose única ou tinidazol 2g via oral em dose única. A posologia alternativa consiste no uso de 500mg de metronidazol via oral durante sete dias (CDC, 2015). Nos Estados Unidos, já foram reportados casos isolados de *T. vaginalis* que apresentaram resistência aos nitroimidazóis (MEITES et al., 2015; KIRKCALDY et al., 2012).

## 1.2 PADRONIZAÇÃO DE PCR E CLONAGEM MOLECULAR

A PCR consiste em uma técnica de amplificação de milhares ou milhões de fragmentos de moléculas de DNA ou cDNA a partir de segmentos definidos. A técnica é considerada rápida, muito sensível, específica e utiliza uma quantidade pequena de amostra para a amplificação do DNA, o que possibilita a sua utilização nas mais diversas áreas da pesquisa e diagnóstico. Para que a PCR tenha uma alta sensibilidade e especificidade é necessário que o processo seja padronizado para cada tipo de amostra a ser avaliada (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012). A reação é realizada *in vitro* e para que ela ocorra são necessários alguns componentes básicos, como por exemplo, o DNA com a sequência-alvo, uma enzima DNA-polimerase termoestável, tampão de reação, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), oligonucleotídeos iniciadores e concentração adequada de  $MgCl_2$ . Além disso, é necessário que haja o aquecimento e resfriamento da amostra, sendo assim, reação depende do equipamento termociclador (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012). A PCR é realizada em fases: a primeira fase consiste no aquecimento da amostra a 95°C que possibilita a desnaturação inicial do DNA-molde; a segunda fase consiste na redução da temperatura (45°-65°) de acordo com as características do oligonucleotídeos iniciadores proporcionando o seu pareamento, e a terceira fase consiste no aumento da temperatura (68°-72°C) para viabilizar a extensão da cadeia de DNA pela enzima polimerase. Esse processo é repetido várias vezes possibilitando a amplificação do DNA-molde (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012).

As padronização das condições de amplificação, tais como concentrações de DNA-molde, enzima polimerase, oligonucleotídeos iniciadores, dNTP, MgCl<sub>2</sub>, e temperatura de hibridização, devem ser definidas para cada iniciador e tipo de amostra (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012).

Outro ponto importante que deve ser avaliado é a aquisição do DNA-molde a partir das mais diferentes amostras. Cada amostra possui uma característica específica que para a reação pode se tratar de produtos inespecíficos e inibidores de reação e, para que os mesmos sejam eliminados, deve-se determinar o melhor método de extração do DNA, que pode ser por métodos *in house* ou *kits* comerciais de extração. Assim como a extração, a seleção e desenho dos iniciadores são etapas importantes para a PCR, além de complementares ao DNA-molde, os iniciadores devem pertencer a regiões mais conservadas dos genes-alvo, devem ser testados previamente *in vitro* ou através de softwares para a formação de dímeros e possuírem T<sub>m</sub> próximos para facilitar a fase de pareamento, para favorecer a sensibilidade e especificidade da reação. (OLIVEIRA, 2007)

O MgCl<sub>2</sub> merece uma atenção especial por ser considerado uma peça chave para que a reação ocorra, pois este é o cofator da enzima polimerase. Altas concentrações deste cofator podem favorecer o aparecimento de fragmentos inespecíficos devido à atividade aumentada da enzima, enquanto concentrações baixas deste cofator são insuficientes para que a enzima atue. Assim como para a concentração do cofator o uso de concentrações altas de dNTP e primer podem implicar no aparecimento de fragmentos inespecíficos (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012; OLIVEIRA, 2007).

Além dos constituintes básicos para a PCR, pode-se adicionar co-solventes que são utilizados para estabilizar os constituintes básicos aumentando a eficiência da reação: são eles glicerol, BSA (*Bovine Serum Albumin*) e DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*). Porém, a concentração alta desses co-solventes podem agir como inibidores de reação, sendo assim, não se recomenda que esses sejam adicionados no início da padronização (SAMBROOK; GREEN, 2012).

A realização da padronização necessita de uma grande quantidade de DNA extraído disponível e de um controle positivo para que os parâmetros sejam avaliados uniformemente, já que, cada constituinte básico da reação deve ser alterado de maneira individualizada até que se tenha o resultado esperado da amplificação. Esse DNA pode ser adquirido de duas formas: através do cultivo dos microrganismos de referência ou

padrão, por exemplo, ATCCs, ou através da clonagem do DNA de referência. Alguns laboratórios que não possuem a infraestrutura para o cultivo dos microrganismos optam por realizar a clonagem molecular (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012; OLIVEIRA, 2007).

Metodologias inovadoras para explorar os principais constituintes de uma célula foram desenvolvidas no início da década de 70 e essas técnicas foram chamadas de tecnologia do DNA recombinante. A técnica central dessa tecnologia é a clonagem molecular que depende da disponibilidade de enzimas que possam cortar, ligar e replicar o DNA (DNA-polimerases), chamadas enzimas de restrição (Figura 5). Em geral, a clonagem molecular compreende os seguintes estágios: (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014)

1. Uma molécula de DNA recombinante é formada pela ligação de um inserto de DNA originado de uma molécula de interesse e um vetor;
2. O vetor com o inserto de DNA devem ser introduzidos a uma célula hospedeira apropriada; esse processo é chamado de transformação;
3. A célula hospedeira, contendo uma única molécula de DNA recombinante, divide-se, várias vezes, formando colônias;
4. As células replicadas com o inserto são então distinguidas, normalmente, pela presença de um gene marcador presente no DNA do vetor de clonagem.

As enzimas de restrição são responsáveis por cortar fragmentos de ambas as fitas da dupla-hélice de DNA, pois reconhecem uma sequência de bases específicas, sendo indispensáveis no isolamento de genes e na criação de moléculas novas de DNA que possam ser clonados (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Figura 5: Desenho esquemático da ação das enzimas de restrição



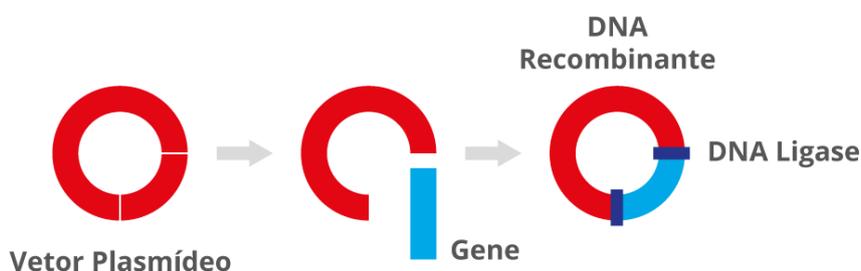
Fonte: <https://kasvi.com.br/clonagem-molecular-dna-recombinante>.

Os fragmentos obtidos pela clivagem com as enzimas de restrição são inseridos nos vetores de clonagem. Os vetores mais utilizados são plasmídeos, DNA de

bacteriófagos ou DNA viral eucariótico. Os plasmídeos estão presentes naturalmente em bactérias e alguns organismos eucarióticos unicelulares. São moléculas de DNA de fita circular, dupla fita, extracromossômica e, geralmente, transportam genes que conferem resistência a antibióticos ou marcas auxotróficas (Figura 6).

As enzimas DNA-ligases são capazes de unir fragmentos de DNA contendo extremidades abruptas ou coesivas. As enzimas formam ligações covalentes entre os nucleotídeos das extremidades do inserto e do vetor. A etapa seguinte é a transformação, responsável por inserir o vetor e o inserto à célula hospedeira adequada - que copiam o DNA do vetor juntamente com o próprio DNA - criando múltiplas cópias do DNA inserido (CARUSO, 2007; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Figura 6: Desenho esquemático do processo de recombinação do vetor com o inserto



Fonte: <https://kasvi.com.br/clonagem-molecular-dna-recombinante>.

A seleção dos clones transformados é um passo crucial na tecnologia do DNA recombinante, já que o vetor inserido na célula hospedeira dá origem a milhões de colônias de bactérias porém, esse processo não tem 100% de sucesso. Para que os clones sejam selecionados, frequentemente, usa-se células hospedeiras que possuem genes marcadores como, por exemplo, um marcador de antibiótico. Dessa forma, as células sem o vetor morrem quando exposta ao antibiótico em questão. Outro gene marcador utilizado é o que produz a enzima chamada beta-galactosidase. A presença dessa enzima faz com que a colônia quando na presença bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactosidase (X-Gal) adquira a cor azul. As colônias azuis não possuem o inserto de DNA enquanto as células que possuem o inserto são brancas. Esse processo ocorre, pois a região os sítios de restrição das enzimas utilizadas para inserir o inserto se localizam onde o gene que codifica a enzima beta-galactosidase está presente, quando o inserto é introduzido o gene da enzima é descontinuado. Após o processo de clonagem, o DNA

obtido deve ser purificado, tendo-se o fragmento desejado em grande quantidade (CARUSO, 2007).

## 2. JUSTIFICATIVA

A tricomoníase é uma infecção sexualmente transmissível (IST), causada por *T. vaginalise* considerada uma infecção parasitária negligenciada. Poucos grupos de pesquisa se concentram em estudar a tricomoníase, conseqüentemente, não houve muito desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e medicamentos para essa condição clínica quando comparada a outras ISTs. Tanto nas infecções sintomáticas como assintomática, que compreendem 80% dos casos, as pacientes não tratados podem evoluir para doença inflamatória pélvica, pode ocorrer parto prematuro, ruptura prematura de membrana amniótica, os recém-nascido podem apresentar baixo peso ao nascer, além disso, a infecção pode aumentar o risco de se adquirir outras ISTs. Nas pessoas infectadas por *T. vaginalis* o risco adquirir infecção pelo HIV aumenta de duas a três vezes.

A introdução de novos testes diagnósticos mais sensíveis contribuirá para melhoria do diagnóstico, vigilância, prevenção e tratamento de infecções por *T. vaginalis*. A maior disponibilidade de modernos testes diagnósticos para melhor detecção e conseqüente tratamento da tricomoníase, em homens e mulheres, pode ser alcançada reduzindo os problemas associadas à infecção por *T. vaginalis*. Sendo assim, o presente trabalho objetivou padronizar uma reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional para o diagnóstico de *T. vaginalis*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar a detecção do protozoário *Trichomonas vaginalis* utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes *kits* de extração de DNA para amostras de urina contendo *Trichomonas vaginalis*;
- Padronizar PCR-convencional para detecção de *Trichomonas vaginalis* com amostras de cultura;
- Padronizar PCR-convencional para detecção de *Trichomonas vaginalis* com amostras de urina;
- Realizar a clonagem de fragmentos de DNA de *Trichomonas vaginalis*.

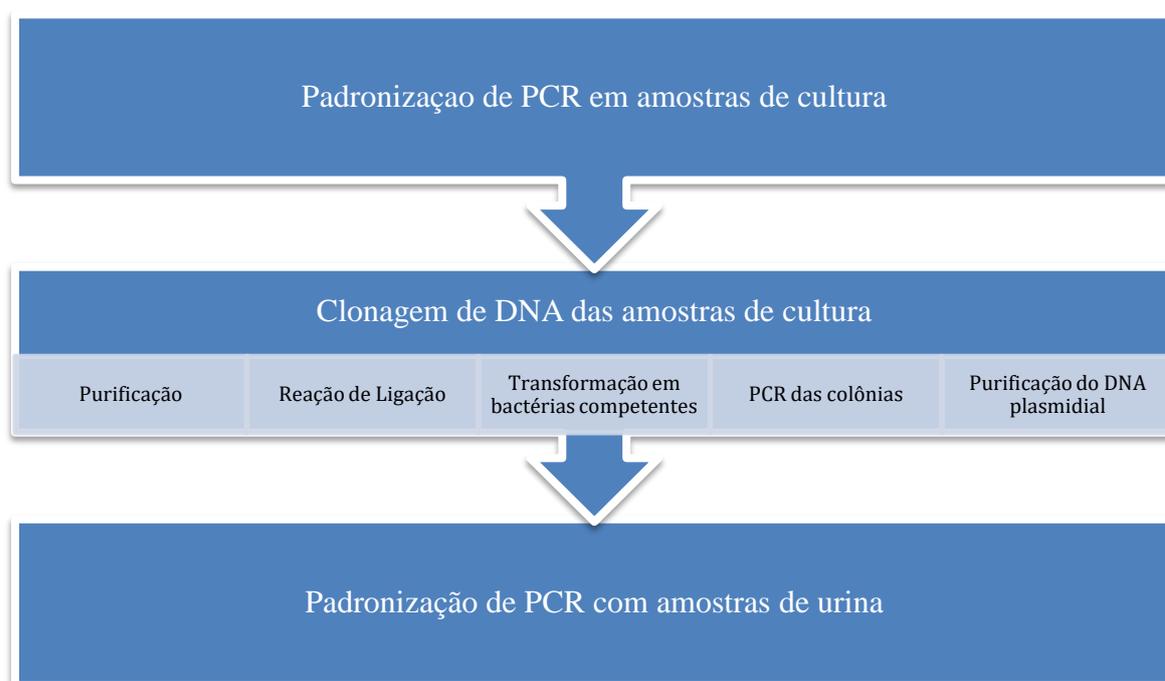
## 4. METODOLOGIA

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR

#### 4.1.2 Desenho experimental

O trabalho foi desenvolvido em três etapas: 1) padronização da PCR para *T. vaginalis* em cultura; 2) clonagem dos produtos de amplificação por PCR obtidos das culturas; e 3) padronização em amostras endocervicais e de urina. Todas as etapas tiveram em comum o processo de extração de DNA, como ilustrado no fluxograma de atividades (Figura 7).

Figura 7: Fluxograma de atividades



Fonte: Desenvolvido pela autora.

#### 4.1.2 Obtenção de amostra de DNA de referência

Para a realização dos ensaios de PCR e clonagem de DNA foi utilizada cultura de cepas ATCC 30236 de *T. vaginalis* que tiveram DNA extraídos utilizando-se o kit comercial QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, EUA) conforme instruções do fabricante.

As culturas de *T. vaginalis* foram gentilmente doadas pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tiana Tasca da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### 4.1.3 Estabelecimento do melhor *kit* de extração para amostras de urina

Para a padronização, foram selecionadas amostras de urina com presença de *T. vaginalis* moveis com a bacteriúria intensa e/ou com presença de hematúria provenientes do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago.

A urina possui muitos inibidores de reação, que podem ser eliminados durante o processo de extração do DNA. Sendo assim, para determinar o melhor *kit* de extração, foi realizada a extração do DNA de duas amostras de urina, em duplicata, utilizando-se quatro *kits* disponíveis no laboratório: *Reliaprep gDNA Blood* (Promega, EUA); *TRIzol<sup>TM</sup> LS Reagente* (INVITROGEN, EUA), *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) e *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA), conforme a instrução de cada fabricante. Para o *kit* *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) foi realizado um pré-tratamento *in house* adaptado de Golfetto (2014). O DNA foi quantificado por espectrofotômetro utilizando o equipamento NanoVue Plus<sup>TM</sup> (Biocrom, EUA).

Como controle da presença de inibidores foi realizada PCR para amplificação do gene da beta-globina humana com os iniciadores PCO3/PCO4 que amplificam um segmento de 110 pares de base (pb). A presença de fragmento em 110pb no gel de agarose indicou ausência de inibidores da PCR (SAIKI et al., 1988).

### 4.1.4 Seleção e desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os iniciadores foram selecionados propondo sua utilização em PCR convencional e PCR-multiplex. Os iniciadores TVK3 (5-ATTGTCGAACATTGGTCTTACCCTC-3') e TVK7 (5-GCATACTTGAAGACGGCACAGA-3') possuem Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) de 66,8°C e 66,3°C, respectivamente, e foram utilizados em PCR convencional. Segundo Kengne e colaboradores (1994), foi demonstrado que esses iniciadores amplificariam um fragmento de 261pb (baseado em sequenciamento realizado), porém, em todas as reações de PCR realizadas, a amplificação revelou um fragmento de 300pb. Outros estudos mais recentes corroboram com os resultados obtidos com fragmento de 300pb (CRUCITTI, 2003; LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000), porém, um estudo demonstrou amplificação de 261pb (PILLAY; LEWIS; BALLAR, 2004). Sendo assim, para este trabalho, foram consideradas aquelas reações que apresentaram fragmentos entre 261 – 300pb (CRUCITTI, 2003; PILLAY; LEWIS; BALLAR, 2004; LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000). Os iniciadores foram previamente testados contra

DNA humano, uma variedade de patógenos sexualmente transmissíveis e outras espécies de *Trichomonas* amplificando apenas o DNA de *T. vaginalis* (KENGNE et al., 1994). Estudos ainda demonstraram que esses iniciadores possuem uma alta sensibilidade (88,0%) e especificidade (97,3%) quando comparados com outros iniciadores (CRUCITTI, 2003; LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000).

Objetivando-se a incorporação da detecção de *T. vaginalis* à PCR-multiplex, os iniciadores específicos devem amplificar fragmentos entre 300 e 400 pb, já que a reação em uso no laboratório já detecta *Chlamydia trachomatis* (201pb), *Neisseria gonorrhoeae* (260pb e 648pb) e controle interno da reação (beta globina humana - 110pb). Os iniciadores foram desenhados utilizando-se a plataforma de desenho de iniciadores PRIMER3. A sequência alvo escolhida está depositada no banco de dados Genbank do NCBI (*National Center for Biotechnology Information/EUA*), cujo no número de acesso é L23861, o qual corresponde à sequência repetida de 2kb do genoma do *T. vaginalis* com alta sensibilidade para o diagnóstico por PCR (KENGNE et al., 1994).

Na plataforma, foram determinados os seguintes parâmetros: a região deveria apresentar cerca de 20 nucleotídeos, uma boa distribuição de bases guanina e citosina (50-60% GC) para tornar mais estável o pareamento dos iniciadores alvo, a temperatura de hibridização dos iniciadores deveria estar entre 50-60°C e o tamanho do produto final deveria conter 300 a 400 pares de bases (SAMBROOK; GREEN, 2012).

Após a seleção dos iniciadores, as sequências foram avaliadas utilizando o BLAST

([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) para verificar a especificidade em detectar *T. vaginalis*. Aqueles que apresentavam possibilidade de reconhecer outros organismos foram excluídos (SAMBROOK; GREEN, 2012). Por fim, os iniciadores selecionados foram avaliados quanto à formação de heterodímeros, *self*-dímeros e *hairpin* utilizando-se a ferramenta online Oligo Analyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). A avaliação foi realizada entre os iniciadores desenhados para *T. vaginalis* e deles com os iniciadores já utilizados na PCR-multiplex. Aqueles que apresentaram a formação de heterodímeros, *self*-dímeros e *hairpin* nas temperaturas utilizadas na PCR-Multiplex foram excluídos.

O par de iniciadores que apresentou os melhores parâmetros preestabelecidos foi selecionado para realização dos protocolos: Tv – 5

ACATTGACGCACTCATGACG-3' (senso) e Tv – 5'-GCCCTCGGAGTCTTTGAATC-3' (anti-senso), que apresentam Tm de 65,0°C e 64,9°C respectivamente. Os iniciadores selecionados, cuja sequência amplifica um fragmento de 356pb, foram adquiridos da empresa Sigma. As sequências de iniciadores selecionados para utilização no presente trabalho estão apresentados no quadro 2.

Tabela 1: Relação dos iniciadores selecionados para amplificação do DNA de *T.vaginalis* e controle interno das reações de PCR.

	Gene	Sequência (5'-3')	Tm° Fabricante	Fragmento
TVK3	Sequência repetida de 2kb	ATTGTCGAACATTGGTCTTACCCTC	66,8°C	260pb
TVK7	Sequência repetida de 2kb	GCATACTTGAAGACGGCACAGA	66,3°C	
TVf	Sequência repetida de 2kb	ACATTGACGCACTCATGACG	65,0°C	358pb
TVr	Sequência repetida de 2kb	GCCCTCGGAGTCTTTGAATC	64,9°C	
PCO3	Beta – globina	ACACAACACTGTGTTCACTAGC		110pb
PCO4	Beta –globina	CAACTTCATCCACGTTCCACC		

Fonte: Sigma, 2018; Kengne et al., 1994; Saiki et al., 1988

#### 4.1.5 Reação de PCR

Para a padronização das condições de amplificação da PCR, utilizou-se dois protocolos bases descrito por Crucitti (2003) e Lawing et al (2000), apresentados na tabela 1 (CRUCITTI, 2003; LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000). A partir deste protocolo foram testadas concentrações diferentes de MgCl<sub>2</sub>, iniciadores, enzima Taq Polimerase, temperatura de pareamento, número de ciclos para amplificação das sequências de DNA e quantidade de DNA extraído a ser utilizado na reação. Todas as reações testadas foram calculadas para um volume final de 25uL.

Tabela 2: Protocolos para detecção de *T. vaginalis* utilizados como base para padronização.

Protocolo CRUCITTI, 2003		
Reagentes	Volume	Concentração final
Tris-HCl (10mM, pH 8,3)	5uL	1mM

MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4uL	2mM
dNTP (2mM)	7uL	0,28mM
TVK3/7 (5uM)	1,5uL	0,15uM
Taq ( <i>Units Taq</i> – 5U/L)	0,4uL	0,04U/L
H <sub>2</sub> O qsp.	20,6uL	-
Amostra (5 – 10 ng/uL)	10uL	-
Volume final	50uL	-

Protocolo LAWING et. al., 2000.

Reagentes	Volume	Concentração final
Tampão 10X	5uL	1X
dNTP (2.5mM)	4uL	0,2mM
Primer	0,5uL	-
Taq (Promega – 5U/L)	0,5uL	0,05mM
H <sub>2</sub> O qsp	29,5uL	-
Amostra	10uL	-
Volume final	50uL	-

Fonte: Adaptado de CRUCITTI, 2003; LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000

As condições de ciclagem para os dois protocolos foram desnaturação inicial a 95°C por 5min., seguido por 35 ciclos 90°C por 1min. (desnaturação), 60°C por 30s. (pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores), 72°C por 2min. (extensão) e 72°C por 7min. (extensão final).

A PCR foi realizada utilizando-se o *kit* de Taq Polimerase GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega, EUA). Os produtos de amplifica o das rea o es foram revelados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, no tampão de corrida Tris- cido Bórico-EDT (TBE)1x a 100V por cerca de 40min. Após a eletroforese, o gel foi revelado em brometo de etídeo (0,5 g/mL), visualizados sob luz UV e fotografados no ImageQuant LAS 500 (GE-EUA) (CRUCITTI, 2003; LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000).O tamanho dos fragmentos foi estimado em compara o com o padrão de tamanho molecular (*ladder* 100pb).

## 4.2 CLONAGEM PARA OBTENÇÃO DE CONTROLES POSITIVOS PARA *Trichomonas vaginalis*

A fim de produzir controles positivos, em altas concentrações, para utilização na PCR de detecção de *T. vaginalis*, os fragmentos amplificados do DNA de cultura da ATCC 30236 foram clonados com o plasmídeo *Pgem – T Easy Vector System* (Promega, USA).

A amplificação dos fragmentos de 261pb e 300pb, correspondente ao par de iniciadores da literatura, foi realizada conforme PCR padronizada neste trabalho e, posteriormente, esses fragmentos foram purificados com o *kit PureLink® PCR Purification Kit*, conforme as instruções do fabricante, para remoção de dNTP, iniciadores e sais dos reagentes utilizados na PCR.

### 4.2.1 Ligação do fragmento purificado ao *pGEM T-Easy Vector System* – Formação do DNA recombinante (inserto)

Após a purificação, o fragmento foi adicionado ao vetor plasmídeo *pGEM – T Easy Vector System* (Promega, USA), seguindo o protocolo:

Quadro 2: Protocolo para reação de ligação

Componentes da Reação	Reação Padrão	Controle positivo	Controle negativo
Tampão de Ligação Rápida 2X	5uL	5uL	5uL
pGEM - T Easy Vector (50ng)	1uL	1uL	1uL
Produto da PCR	XuL	-	-
Controle DNA	--	3uL	-
T4 DNA Ligase (3U/uL)	1uL	1uL	1uL
H <sub>2</sub> O livre de nuclease para volume final de:	10uL	10uL	10uL

Fonte: Adaptado de PROMEGA, 2010.

O produto da PCR é determinado a partir da razão molar fornecida pelo *kit* no qual depende do tamanho do produto a ser amplificado e uma relação de 3:1 de produto amplificado para vetor. Realiza-se então uma regra de três para determinar o volume a ser pego do DNA purificado para obter-se a quantidade de inserto (figura 8).

Figura 8: Razão molar para determinação do volume de produto da PCR

$$\frac{ng\ de\ vetor \times tamanho\ do\ produto\ amplificado(kb)}{tamanho\ do\ vetor(kb)} \times razão\ molar\ produto: vetor = ng\ de\ inserto\ (1)$$

$$\begin{aligned} &1\mu L - ng\ de\ DNA\ purificado \\ &X - ng\ de\ inserto \end{aligned} \quad (2)$$

Fonte: Adaptado de PROMEGA, 2010.

Plasmídeos são moléculas de DNA fita dupla, extracromossomal e circulares encontrados em todas as espécies de bactérias. O plasmídeo pGEM®- T Easy já se encontra linearizado devido à preparação por meio da digestão com a enzima EcoRV e suas extremidades contém uma cauda poli-T. Essa modificação melhora a eficiência da ligação dos produtos de PCR, uma vez que, durante a reação de PCR, as polimerases adicionam uma calda poli-A no final do produto de PCR gerado o que aumenta a afinidade da ligação (PROMEGA, 2010).

#### 4.2.2 Transformação e purificação do DNA plasmidial

Esta etapa consiste em inserir o DNA recombinante (plasmídeo + fragmento de DNA) à uma bactéria competente e, geralmente, nesse processo utiliza-se bactérias *Escherichia coli*. No presente estudo foi utilizado o choque térmico, de acordo com o protocolo apresentado a seguir:

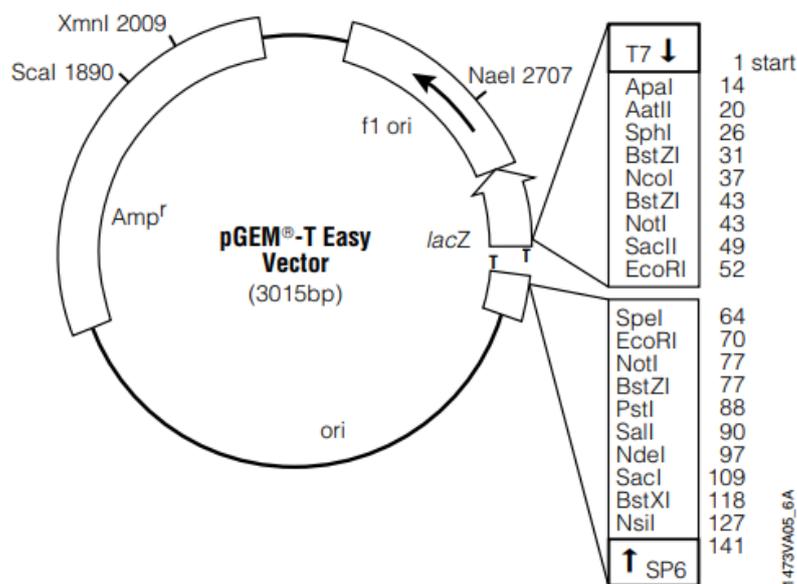
- Descongelar as células em banho de gelo por 5 a 10 minutos.
- Adicionar 2uL do DNA recombinante na célula e homogeneizar sem pipetar;
- Incubar a mistura em banho de gelo por 30 minutos.
- Incubar em banho-maria a 42°C por 90 segundos.
- Transferir imediatamente o tubo para o gelo, incubando por 2 minutos.
- Adicionar 900 uL de meio LB nas células e homogeneizar sem pipetar.
- Incubar por 1h a 37°C sob agitação de 100 rpm.
- Centrifugar a amostra por 1 minuto a 8000rpm
- Retirar 900uL do sobrenadante e homogenizar o restante.
- Plaquear ± 100 uL com alça de Drigalski em placa de Petri contendo meio LB, ampicilina (100mg/ml), X-gal (20mg/ml) e IPT-G (200mg/ml).

- Passar a alça de Drigalski até a completa absorção no meio.

O processo choque térmico consiste na preparação das bactérias para torná-las competentes por meio de tratamento com cloreto de cálcio e mudança brusca de temperatura. As moléculas de DNA passam através de canais situados nas zonas de adesão. Em condições naturais, a captação de DNA pela célula é difícil devido à repulsão eletrostática, já que o DNA e a membrana possuem cargas negativas. Para contornar a situação, utilizam-se íons de cálcio, que atuam formando um complexo cobrindo as cargas negativas da membrana da bactéria, facilitando a atração eletrostática com as moléculas do DNA na zona de adesão. A mudança brusca de temperatura completa o processo de captação do DNA, auxiliando na criação dos poros na membrana e o plasmídeo pode alcançar o interior da célula (GOLFETTO, 2014; ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Uma das maneiras de verificar a efetividade do processo de transformação é através da coloração da colônia crescida no LB com ampicilina, X-gal e IPTG e incubadas a 37°C overnight, isso por que todo o plasmídeo é composto por uma região promotora, um sítio de clonagem, uma origem de replicação e um gene que codifica a resistência a antibiótico (Figura 8) (GOLFETTO, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012).

Figura 9: Representação esquemática do plasmídeo pGEM-T easy vector



Fonte: PROMEGA, 2010.

Ainda como forma de avaliar a efetividade da transformação foram selecionadas 10 colônias, com o auxílio de uma ponteira, e realizado a PCR para observar a presença do fragmento inserido, conforme o protocolo D presente na seção 5.1.2 presente na página 40.

Após a confirmação pela PCR, as colônias positivas (que apresentaram vetor + inserto) foram inoculadas em meio líquido LB e 100ug/mL de ampicilina e incubadas a 37°C com agitação constante por 16 horas. Esse processo é realizado a fim de obter-se uma quantidade superior de bactérias transformadas (GOLFETTO, 2014).

A purificação do DNA plasmidial é uma etapa importante para a clonagem molecular, neste trabalho foi utilizando o protocolo adaptado de Sambrook e Green (2012), descrito a seguir, disponível no laboratório que tem como fundamento a lise alcalina em combinação com detergentes SDS (*Sulfate Dodecyl Sodium*).

- Descongelar o eppendorf contendo a bactéria transformada congelada em um tubo de caldo LB + Ampicilina (ou inocular uma colônia da bactéria transformada) e incubar a cultura overnight a 37°C sob agitação.
- Transferir 1,5 ml da cultura para um microtubo estéril;
- Centrifugar em velocidade máxima por 30 segundos em centrífuga refrigerada a 4°C.

- Remover o meio de cultura por aspiração mantendo o sedimento bacteriano o mais seco possível.
- Ressuspender o sedimento bacteriano em 100  $\mu\text{L}$  de solução de lise alcalina I (anexo 1) (gelada) e homogeneizar no vórtex;
- Preparar a solução alcalina II (anexo 1) (na hora) e adicionar 200  $\mu\text{L}$  em cada suspensão bacteriana. Homogeneizar por inversão cinco vezes (não homogeneizar em vórtex).
- Adicionar 150  $\mu\text{L}$  da solução alcalina III (anexo 1) gelada. Homogeneizar por inversão várias vezes. Manter o tubo no gelo por 5 minutos.
- Centrifugar o lizado bacteriano na velocidade máxima por 5 minutos a 4°C e transferir o sobrenadante para um eppendorf novo.
- Para precipitação do DNA plasmidial, adicionar 2 volumes de etanol PA a temperatura ambiente.
- Centrifugar a velocidade máxima por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C
- Remover o sobrenadante e retirar o excesso de álcool com papel toalha.
- Adicionar álcool 70% e homogeneizar por inversão várias vezes.
- Centrifugar em velocidade máxima por 2 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C
- Remover o sobrenadante e retirar o excesso de álcool com papel toalha.
- Colocar o tubo aberto a temperatura ambiente até a completa evaporação do álcool (10-15 min).
- Ressuspender o DNA plasmidial em tampão TE pH 8,0.
- Adicionar 1  $\mu\text{L}$  de RNase e deixar a temperatura ambiente overnight.

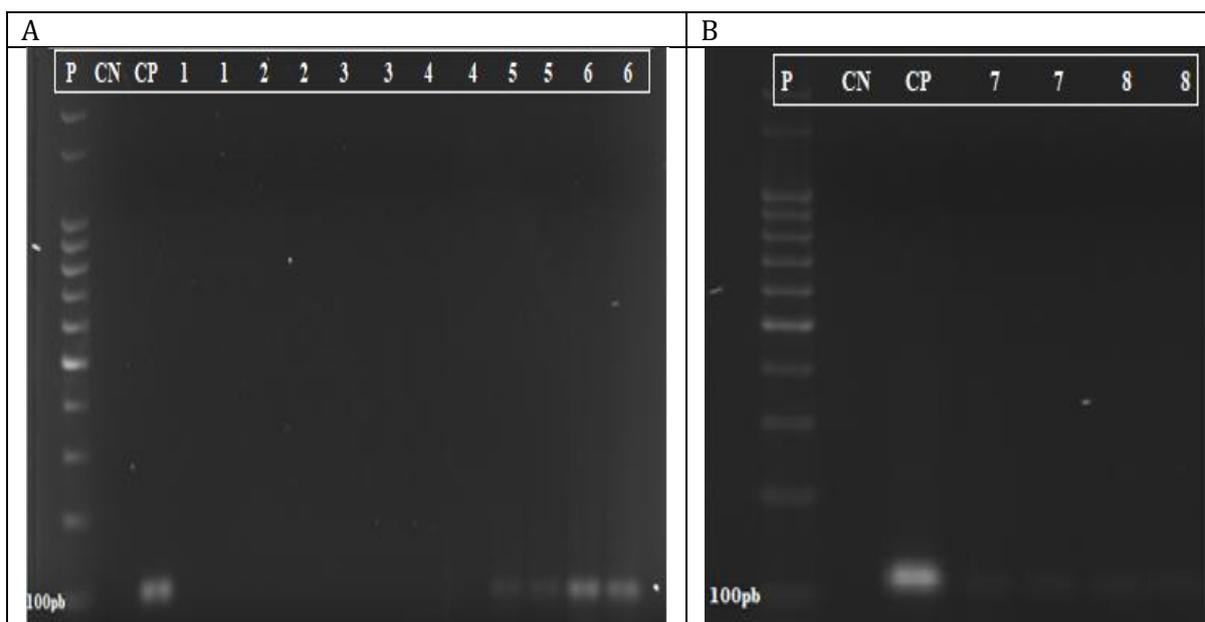
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR

#### 5.1.1 Extração de DNA para padronização.

A extração do DNA da amostra é uma etapa limitante para a realização da PCR. Inibidores de reação podem estar presentes, mesmo após a extração, impedindo que a mesma ocorra ou favoreça o aparecimento de fragmentos inespecíficos. Neste trabalho, foram utilizados quatro *kits* comerciais de extração de DNA, seguidos de PCR para o gene beta-globina a fim de avaliar a presença de inibidores. Como ilustrado na figura 9, os *kits* *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) e *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) foram os únicos a amplificarem o fragmento de 110pb correspondente ao gene beta-globina, se mostrando mais eficientes na eliminação dos inibidores de reação.

Figura 10: Fotografia do gel de agarose dos produtos da PCR para beta-globina



Legenda: P, padrão tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; CP, controle positivo; (A) 1 e 2 extração de DNA com *kit Reliaprep gDNA Blood* (Promega, EUA); 3 e 4 extração de DNA com *kit TRIzol<sup>TM</sup> LS Reagente* (INVITROGEN, EUA); 5 e 6 extração de DNA com *kit QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA); (B) 7 e 8 extração de DNA com *kit QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) adaptado. Fonte: Desenvolvido pela autora

Os *kits* comerciais são fáceis de usar, possuem instruções simples e claras, são projetados para a purificação de uma ampla variedade de amostras e produzem

resultados reprodutíveis. Eles possuem uma base estável de técnicas altamente confiáveis que podem ser incorporadas em tarefas automatizadas e hoje são considerados indispensáveis em muitos laboratórios, já que economizam muito tempo e esforço nas investigações laboratoriais. Além disso, qualquer pessoa com experiência laboratorial limitada poderá usar o *kit* para extrair e purificar DNA (SAMBROOK; GREEN, 2012). A utilização de *kits* comerciais, neste trabalho, teve o intuito de agilizar e otimizar o processo de extração, visto o interesse em utilizar a PCR na rotina laboratorial.

A quantificação do DNA utilizado para realizar a padronização variou de 145,0 – 5,2ng/uL. Este resultado está relacionado com a quantidade de células presentes em cada uma das urinas extraídas, sendo que algumas possuíam alta contagem de células epiteliais, leucocitárias e hemáticas, enquanto outras amostras apresentaram baixa celularidade. Este dado encontrado é importante para justificar o fato de que algumas urinas extraídas apresentaram ampliações de beta-globina com fragmentos fortes, enquanto outras apresentaram fragmentos mais fracos.

Os resultados do presente trabalho corroboram com alguns resultados encontrados no estudo realizado por Bali e colaboradores (2014), que compararam sete *kits* comerciais a fim determinar os melhores *kits* para extração de DNA em amostras de urina. Quando comparado os resultados é possível observar que o *kit Reliaprep gDNA Blood* (Promega, EUA) não demonstrou bons resultados e que o *kit QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) apresenta bons resultados em todos os testes realizados (BALI et al., 2014).

Como foi realizado a quantificação por espectrofotômetro, a concentração de DNA nas amostras extraídas pelo *kit QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) podem ser superestimada, pois este método não é capaz de discernir DNA de RNA. (BALI et al., 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012). Sendo assim, o *kit* escolhido para continuar com os testes foi *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) adaptado, por apresentar um volume de rendimento e melhor quantificações melhores (tabela 3)

Tabela 3: Quantificação de DNA por espectrofotômetro.

Kit comercial	Amostra	Concentração (ng/uL)	A260/280	A260/A230
<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	1	16,5	1,737	1,003
	2	24,5	1,728	1,119
<i>QIAamp Viral RNA Mini Kit</i>	1	39,0	1,857	0,107
	2	47,5	1,792	0,177

Fonte: Desenvolvido pela autora

### 5.1.2 Padronização de PCR em amostras de cultura

O primeiro protocolo testado foi o apresentado por Kengne e colaboradores (1994), modificado por Crucitti e colaboradores (2003), alterando-se apenas a marca da enzima Taq e conseqüentemente o tampão de reação. Para este primeiro protocolo não foi observada amplificação do DNA.

O segundo e terceiro protocolos testados foram denominados de protocolo A e protocolo B, nos quais foram feitas variações nas concentrações de MgCl<sub>2</sub>, iniciadores e manteve-se a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores, porém foram alteradas as condições da PCR (tempo e número de ciclos).

Na tabela 3 estão especificados os volumes utilizados para os protocolos realizados neste trabalho para amostras de cultura. Os protocolos utilizando os iniciadores da descritos na literatura e os iniciadores desenhados foram feitos utilizando-se as mesmas amostras.

Tabela 4: Diferença nas concentrações dos constituintes básicos e condições da PCR entre o protocolo de Crucitti et. al. (2003) e as modificações testadas neste estudo para amostras de cultura.

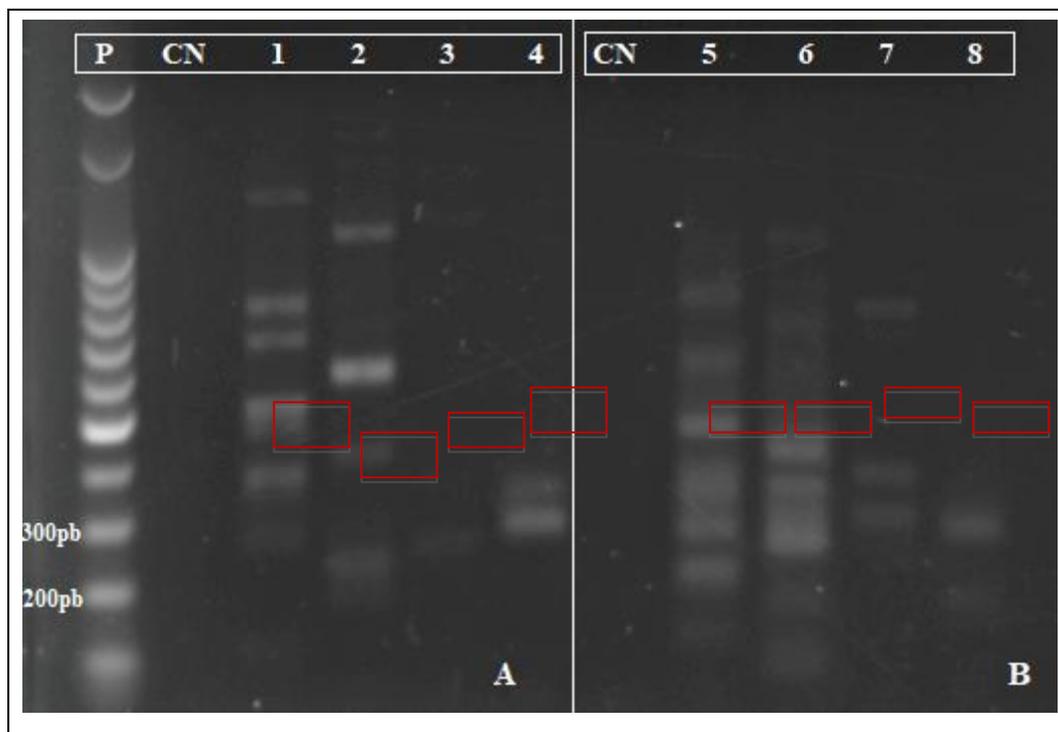
Reagentes	Crucitti e colaboradores (2003)					
	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C	Protocolo D	Protocolo E	
MgCl <sub>2</sub>	2,0nM	2,0nM	1,5nM	2,0nM	2,0nM	1,5nM
Primer	0,15uM	0,2uM	0,2uM	0,28nM	0,4uM	0,28uM
Taq	0,04U/uL	0,04U/uL	0,04U/uL	0,04U/uL	0,05U/uL	0,04U/uL
dNTP	0,28nM	0,25nM	0,25nM	0,25nM	0,3nM	0,25nM

DNA	-	-	-	-	-	-
BSA (0,1mg/mL)	-	-	-	-	0,01mg/mL	-
<b>Ciclagem</b>	<b>Crucitti (2003)</b>	<b>Protocolo A</b>	<b>Protocolo B</b>	<b>Protocolo C</b>	<b>Protocolo D</b>	<b>Protocolo E</b>
Tempo/T° Desnaturação	1min./90°C	45s/95°C	45s/95°C	45s/95°C	45s/95°C	45s/95°C
Tempo/T° Pareamento	30s./60°C	1:30min./60°C	1:30min./60°C	45s./57°C	45s./58°C	45s./60°C
Tempo/T° Extensão	2min./72°C	1:10min./72°C	1:10min./72°C	1:10min./72°C	1:10min./72°C	1:10min./72°C
N° de ciclos	35 ciclos	40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos

Fonte: Desenvolvido pela autora.

A figura 11 mostra a foto do gel de eletroforese com os produtos de amplificação do protocolo A e B para os iniciadores da literatura. Pode-se observar que as alterações realizadas para o protocolo A e B não foram satisfatórias, pois ambos protocolos apresentaram elevado número de fragmentos inespecíficos.

Figura 11: Fotografia do gel de agarose dos produtos dos protocolos A e B realizados com DNA obtido de de cultura de *Trichomonas vaginalis*.



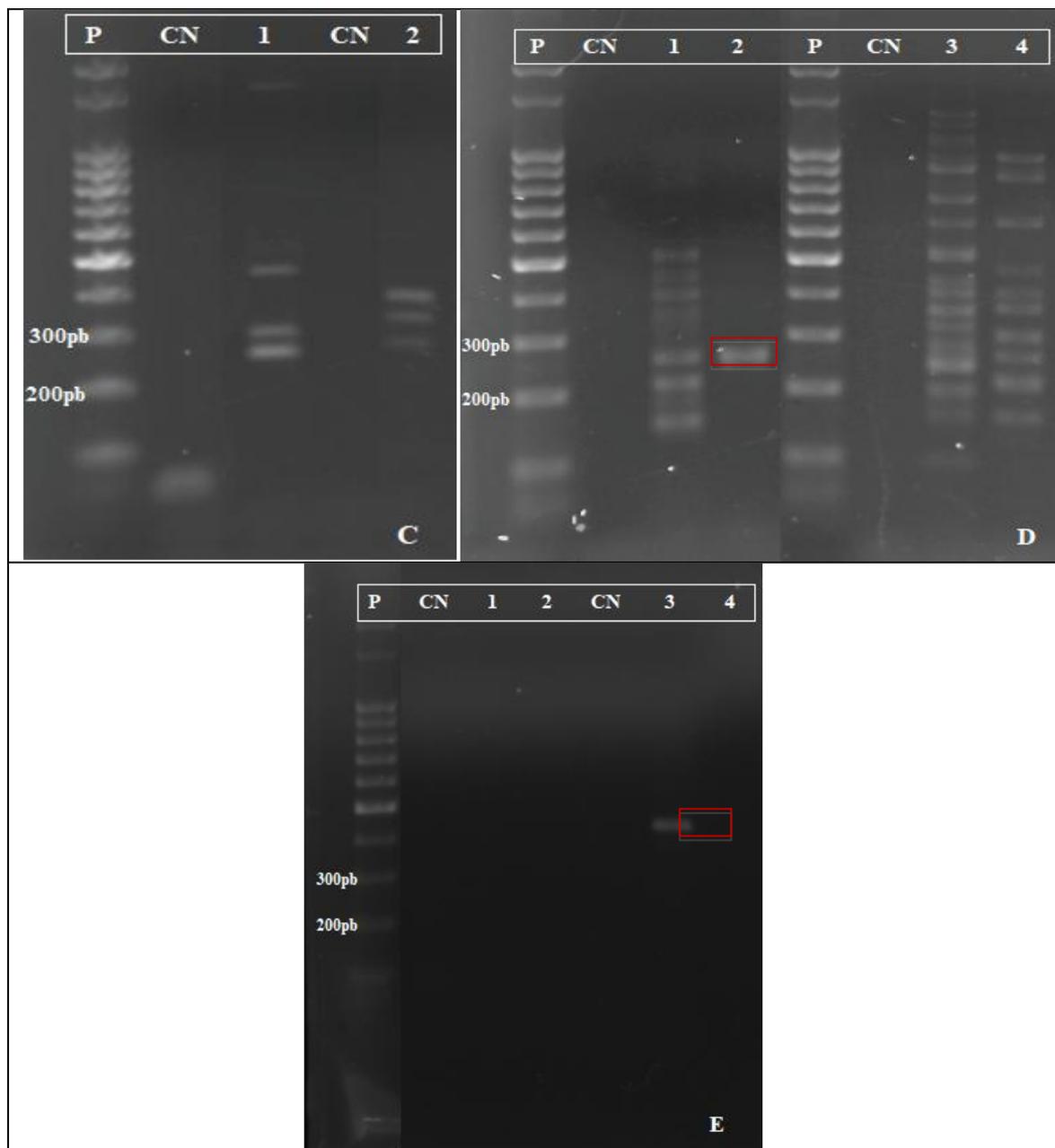
Legenda: Quadrado vermelho, fragmento esperado (261 - 300pb); A: protocolo A; P, padrão de tamanho molecular 100pb; CN, controle negativo; 1– 2 DNA obtido de cultura de *T. vaginalis* realizada PCR com iniciadores da literatura. B: protocolo B; P, padrão tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; 5 – 8 DNA obtido de cultura realizada PCR com iniciadores da literatura. Fonte:Desenvolvido pela autora

A fim de otimizar a reação para a amplificação dos fragmentos de 261pb e 300pb, para os iniciadores da literatura, e de 356pb para os iniciadores desenhados, foi realizado o protocolo com o protocolo C, no qual foram alteradas as concentrações de iniciadores com relação ao protocolo A. Além dos constituintes básicos da reação, também foram alterados o tempo e a temperatura de pareamento. Mesmo com as alterações do protocolo C, não foram observados resultados satisfatórios: houve uma diminuição no número de amplificações, porém ainda houve a presença de amplificações inespecíficas.

Devido ao ocorrido no protocolo C, foi realizado o protocolo D, no qual foram alterados os constituintes básicos da reação, exceto  $MgCl_2$  e DNA, e condição de PCR quando comparado ao descrito por Crucitti et. al. (2003). Ainda para o protocolo D foi adicionado BSA (0,1mg/mL) como co-solvente para a estabilização dos constituintes básicos. O resultado desta reação foi satisfatório apenas para o iniciador descrito pela literatura, tendo sido observado o fragmento de aproximadamente 300pb conforme indicado na figura 12.

A falta de amplificação no protocolo D e E para o iniciador desenhado exigiu que fosse projetado um protocolo E, sendo esse realizado apenas para o iniciador desenhado. Os resultados obtidos dos protocolos C – E estão ilustrados na figura 12.

Figura 12: Fotografia do gel de agarose dos produtos dos protocolos C – E realizados para DNA obtido de cultura de *Trichomonas vaginalis*.



Legenda: C: protocolo C; P, padrão de tamanho molecular 100pb; CN, controle negativo; 1 DNA obtido de cultura de *T. vaginalis* realizada reação com iniciadores da literatura; 2, DNA obtido de cultura de *T. vaginalis* realizada reação com iniciadores desenhados. D: protocolo D; P, padrão de tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; 1 e 2 DNA obtido de cultura de *T. vaginalis* realizadas com iniciadores da literatura; 3 e 4 DNA obtido de cultura de *T. vaginalis* realizadas com iniciadores desenhados. E: protocolo E; P, padrão de tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; 1 e 2 DNA obtido de cultura de *T. vaginalis* realizada reação com iniciadores da literatura; 3 e 4, DNA obtido de cultura de *T. vaginalis* realizadas com iniciadores desenhados. Fonte: Desenvolvido pela autora.

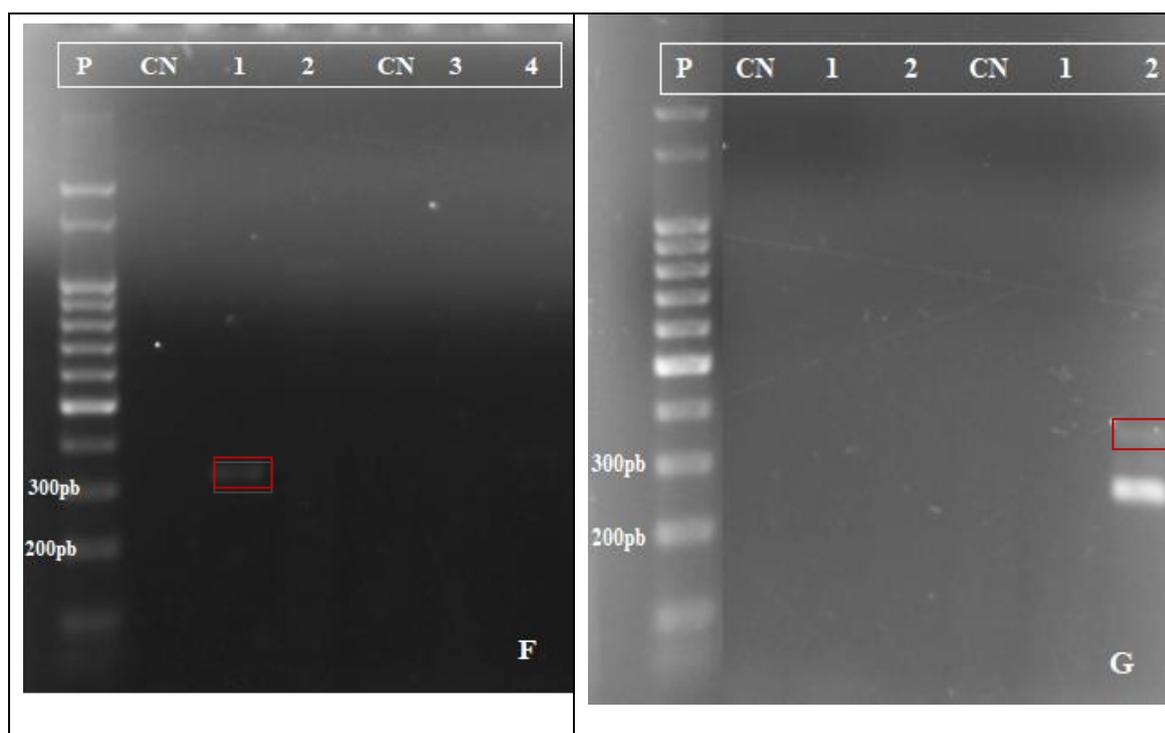
Outros protocolos foram testados com as amostras do protocolo D e E para observar se as modificações ainda mantinham a amplificação. Dois desses protocolos amplificaram amostras um para cada tipo de iniciador. Os protocolos estão apresentados na tabela 5 e ilustrados na figura.

Tabela 5: Volumes dos constituintes básicos e condições da PCR usados no laboratório para DNA obtido de cultura de *Trichomonas vaginalis*.

Reagentes	Protocolo F	Protocolo G
MgCl <sub>2</sub>	1,5nM	2,0nM
Primer	0,28uM	0,2uM
Taq	0,04U/uL	0,5U/uL
Dntp	0,25nM	0,3nM
DNA	-	-
Ciclagem	Protocolo F	Protocolo G
Tempo/T° Desnaturação	1min./90°C	45s/95°C
Tempo/T° Pareamento	45s./58°C	1:30min./60°C
Tempo/T° Extensão	2min./72°C	1:10min./72°C
N° de ciclos	40 ciclos	40 ciclos

Fonte: Desenvolvido pela autora

Figura 13: Fotografia do gel de agarose dos produtos dos protocolos F e G realizados para DNA obtido de cultura de *Trichomonas vaginalis*.



Legenda: Quadrado vermelho, fragmentos esperadas. F, protocolo F; P, padrão de tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; 1 e 2 DNA obtido de cultura realizada reação com iniciadores da literatura; 3 e 4DNA obtido de cultura realizada reação com iniciadores desenhados. G: protocolo G; P, padrão de tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; 1 e 2 DNA obtido de cultura realizada reação com iniciadores da literatura; 3 e 4DNA obtido de cultura realizada reação com iniciadores desenhados. Fonte: Desenvolvido pela autora.

A padronização de PCR requer grande quantidade de DNA. Devido o laboratório não possuir a cultura padronizada, os ensaios foram realizados com cultivos doados e o rendimento da extração por coluna do DNA das culturas generosamente doadas foi baixo, assim não foi possível obter DNA em quantidade suficiente para otimizar os protocolos que apresentaram melhor desempenho. Além do mais, a padronização da PCR para cultura foi realizada com o propósito de se obter o fragmento purificado para clonagem do DNA, obtendo maior quantidade para a realização da padronização da PCR em amostras endocervicais e urina.

### **5.1.3 Padronização da PCR com amostras biológicas**

Devido ao tempo reduzido e a dificuldade na padronização da PCR para DNA obtido de cultura que foram clonados, as amostras utilizadas para iniciar a padronização da PCR com DNA obtido de amostras biológicas foram amostras de urina positivas para *T. vaginalis* cedidas pelo setor de Urinálise da Divisão de Análises Clínicas do HU/UFSC. O mesmo protocolo descrito por Crucitti e colaboradores (2003) foi realizado, sem alterações, no qual não se obteve amplificação.

Os constituintes alterados para a padronização com DNA obtido de amostras de urina foram  $MgCl_2$  (1,5nM e 2,0nM), iniciadores (0,2uM – 0,4uM), dNTP (0,25nM e 0,3nM); Taq (0,2nM – 0,3nM); BSA (0,01mg/mL); Glicerol 50% (2,5%). Com relação às condições de PCR, foram alterados a temperatura (60; 58; 57; 55°C) e o tempo de pareamento (45s) e número de ciclos (35 ciclos e 40 ciclos). Assim como ocorreu na padronização de amostras de cultura não foram realizados todos os protocolos necessários. Para cada protocolo realizado foram utilizadas amostras diferentes. Devido ao pequeno volume de amostras obtidas, após cada extração, não foi possível utilizar as mesmas amostras para todos os protocolos realizados. Os protocolos no qual foram observadas ampliações estão descritos na tabela 4 e os resultados estão demonstrados na figura 12.

Tabela 6: Diferença nos volumes dos constituintes básicos e condições de PCR entre o protocolo de Crucitti et. al. (2003) e os testados no laboratório para DNA obtido de amostras de urina.

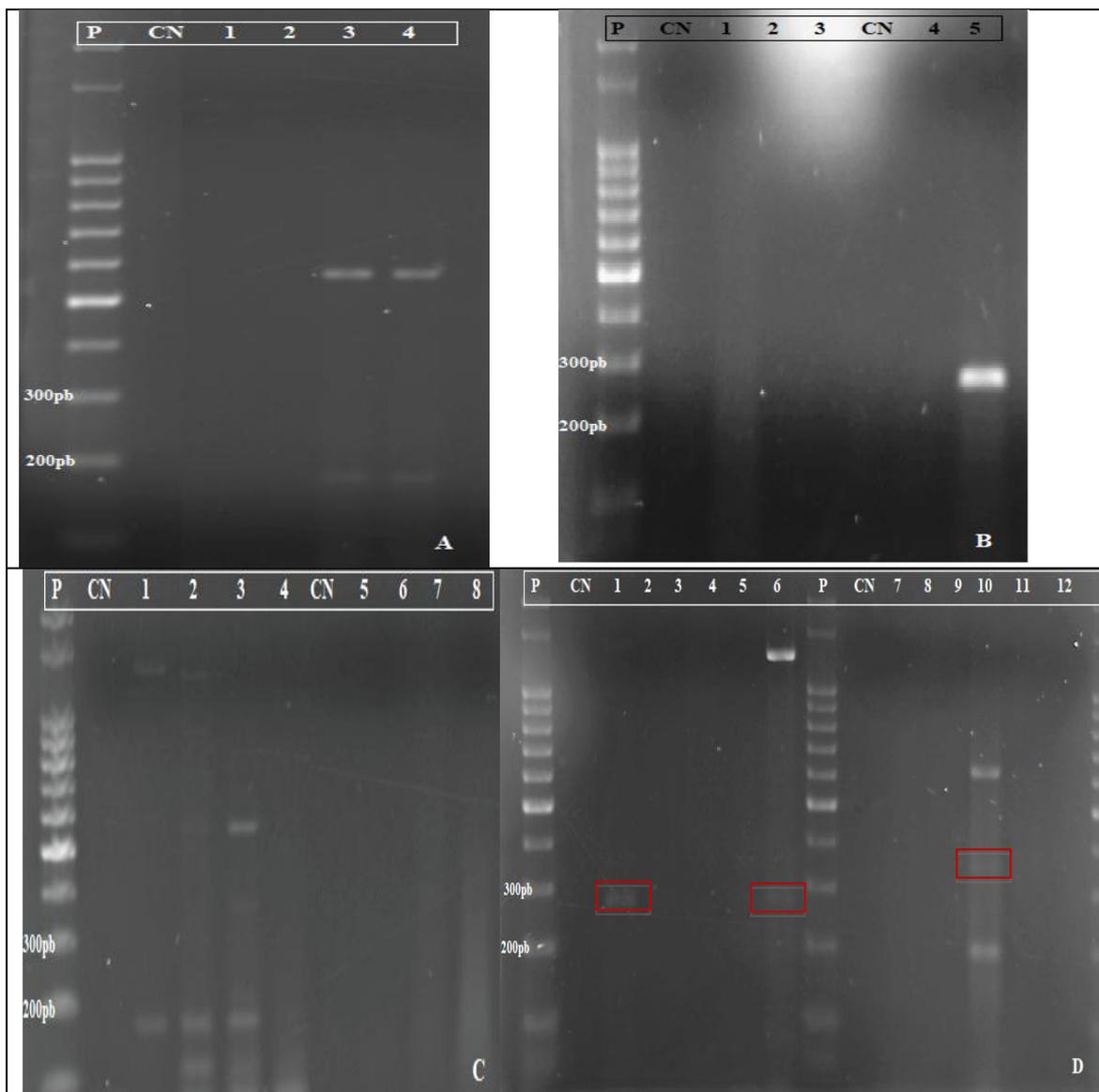
Reagentes	Crucitti				
	et. al. (2003)*	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C	Protocolo D
MgCl <sub>2</sub>	2,0nM	1,5nM	2,0nM	2,0nM	2,0nM
Primer	0,28uM	0,2uM	0,28uM	0,28uM	0,4uM
Taq	0,04U/uL	0,04U/uL	0,04U/uL	0,04U/uL	0,05U/uL
dNTP	0,28nM	0,25nM	0,25nM	0,25nM	0,3nM
DNA	5uL	-	-	-	-
BSA (0,1mg/mL)	x	x	x	x	0,01mg/mL

Ciclagem	Crucitti				
	et. al. (2003)	Protocolo A	Protocolo B	Protocolo C	Protocolo D
Tempo/T° Desnaturação	1min./90°C	45s./95°C	45s./95°C	45s./95°C	45s./95°C
Tempo/T° Pareamento	30s./60°C	45s./58°C	45s./58°C	45s./57°C	45s./57°C
Tempo/T° Extensão	2min./72°C	1:10min./72°C	1:10min./72°C	1:10min./72°C	1:10min./72°C
N° de ciclos	35 ciclos	40ciclos	40ciclos	40ciclos	40ciclos

Legenda:\*os valores foram alterados para um volume de 25uL para facilitar a visualização das alterações realizadas. Fonte: Desenvolvido pela autora

Figura 14: Fotografia do gel de agarose dos produtos dos protocolos A – D realizados para DNA obtido de amostras de urina.



Legenda: Quadrado vermelho, fragmentos esperadas; A: protocolo A; P, padrão de tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; 1 e 2 DNA obtido de urina realizada reação com iniciadores desenhados; 3 e 4, DNA obtido de urina realizada reação com iniciadores da literatura. B: protocolo B; P, padrão de tamanho molecular 100pb; CN, controle negativo; 1 – 3 DNA obtido de urina realizada reação com iniciadores da literatura; 4 e 5 DNA obtido de urina realizada reação com iniciadores desenhados. C: protocolo C; P, padrão de tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; 1 – 4 DNA obtido de urina realizada reação com iniciadores da literatura; 5 – 8 DNA obtido de urina realizada reação com iniciadores desenhados. D: protocolo D; P, padrão de tamanho molecular 100pb; CN, controle negativo; 1 – 6 DNA obtido de urina realizada reação com iniciadores da literatura; 7 – 12 DNA obtido de urina realizada reação com iniciadores desenhados. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Em todos os resultados obtidos neste trabalho observa-se, nos géis de agarose, ampliações inespecíficas, sendo necessário realizar novos protocolos para obtenção de resultados que apresentem apenas o fragmento com tamanho desejado. Nos protocolos A, B e C os fragmentos apresentam fragmento menor que o esperado, já no protocolo D uma das amostras de urina mostrou resultados satisfatórios para o iniciador da literatura, porém a mesma não apresentou amplificação para o iniciador desenhado. Ainda no protocolo D, para o iniciador desenhado, observa-se em uma das amostras o fragmento de 356pb juntamente com outras ampliações inespecíficas, porém esta mesma amostra não apresentou amplificação para o iniciador da literatura.

As reações para a padronização da PCR com DNA obtido de amostras de cultura e de urina foram testadas paralelamente, sendo assim, foi possível observar que as amostras se comportavam de maneira diferente. Os protocolos da literatura descrevem a temperatura de 60°C como sendo a ideal para a amplificação, enquanto que para este estudo nesta temperatura não foi observada amplificação mesmo com as alterações de MgCl<sub>2</sub>, iniciadores, adição de co-solventes (BSA 0,1mg/mL e Glicerol 50%) e tempo de pareamento (LÓPEZ-MONTEON et al., 2013;LAWING; HEDGES; SCHWEBKE, 2000; SCHEE, C. et al., 1999). Quando a temperatura foi reduzida para 55°C mantendo-se as condições do protocolo D, com o qual obteve-se melhor resultado dentre os demais protocolos realizados, encontrou-se fragmentos inespecíficos. Este resultado ocorre porque temperaturas de pareamento baixas favorecem a ligação inespecífica dos iniciadores, resultando em ampliações de fragmentos indesejados (SAMBROOK; GREEN, 2012).

Os resultados obtidos no presente trabalho não se assemelham com os descritos na literatura, mesmo utilizando-se os protocolos descritos. Dentre os fatores que podem estar relacionados com essa diferença temos: as amostras utilizadas nos estudos foram extraídas com protocolos diferentes dos utilizados nesse trabalho; a enzima Taq utilizada neste trabalho não foi descrita em nenhum dos outros estudos que utilizaram esses iniciadores.

Além disso, foram utilizadas diferentes amostras de urina e protocolos com alteração de mais de um constituinte básico de reação, o que não é recomendado quando se está realizando uma padronização. A amostra deve ser a mesma para protocolos diferentes, já que cada amostra tem uma característica e, no caso deste trabalho, cada amostra continha uma quantidade diferente do protozoário, o qual não era possível

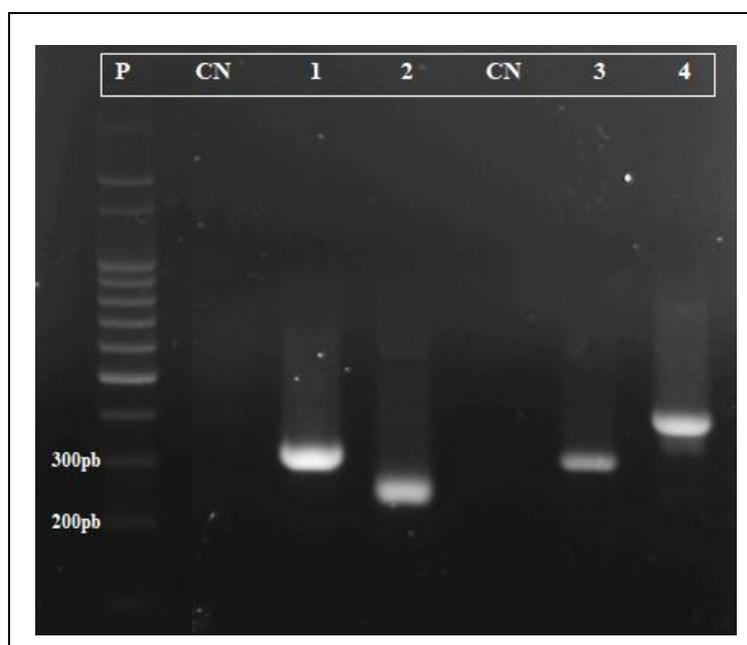
quantificar. Já os constituintes básicos devem ser alterados individualmente para melhor visualização da padronização (SAMBROOK; GREEN, 2012).

## 5.2 CLONAGEM MOLECULAR

Para a realização da etapa de clonagem, foram selecionadas as amostras que amplificaram fragmentos únicas amostra 2 do protocolo D (agora denominada de amostra 1), amostra 3 do protocolo E (agora denominada de amostra 2), amostra 1 do protocolo F (agora denominada de amostra 3) e amostra 2 do protocolo G (agora denominada de amostra 4). Todos os protocolos estão descritos no item 5.1.2.

Essas amostras foram purificadas utilizando o *kit PureLink® PCR Purification Kit*, conforme o protocolo descrito pelo fabricante. Posteriormente, foi realizado o protocolo da PCR de cada amostra afim de confirmar a purificação e para aumentar a quantidade de DNA, para realização de nova purificação e quantificação do DNA purificado. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 15 e tabela 6.

Figura 15: Fotografia do gel de agarose dos produtos da purificação



Legenda: P, padrão de tamanho molecular de 100pb; CN, controle negativo; 1 e 2, amostras 1 e 2 purificadas realizada reação com iniciadores da literatura (fragmento 261 - 300pb); 3 e 4, amostras 3 e 4 purificadas realizada reação com iniciadores desenhados (fragmento 358pb).

Fonte: Desenvolvido pela autora.

Tabela 7: Quantificação das amostras purificadas por espectrofotômetro

Amostra	Concentração (ng/uL)	A260/280	A260/A230
1	54,0	1,800	2,512
2	45,5	1,784	2,676
3	15,3	1,700	3,030
4	17,5	1,699	3,211

Fonte: Desenvolvido pela autora

Devido aos produtos de amplificação das amostras tamanhos diferentes, as mesmas foram encaminhadas para o sequenciamento, que foi realizado pela empresa Ludwing ACTGene (Rio Grande do Sul, Brasil), com o intuito de identificar se a amplificação realmente tratava-se de DNA de *T. vaginalis*.

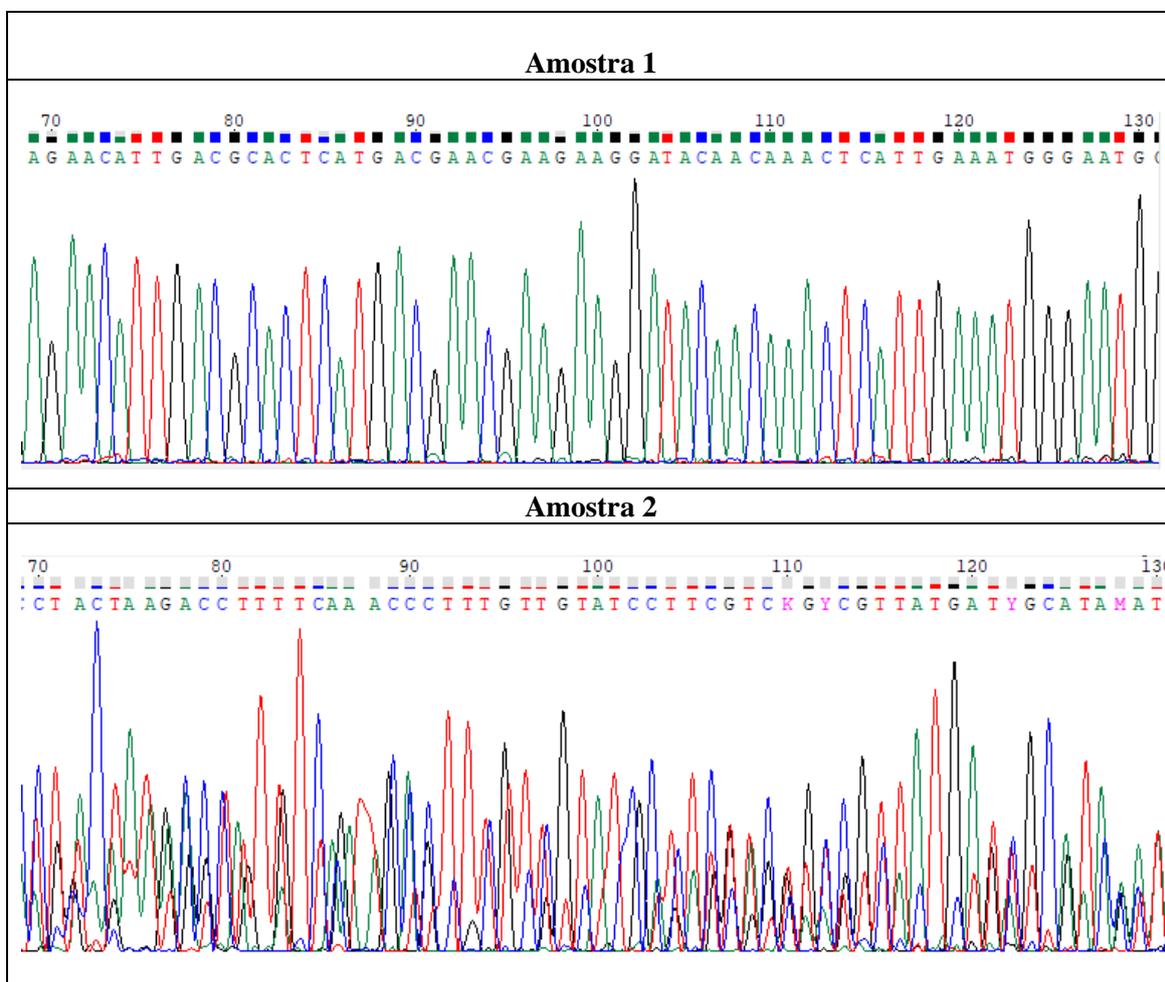
O sequenciamento é o processo de determinação da sequência de nucleotídeos (A, T, C, G) em um fragmento de DNA. No final de 1970, dois métodos foram desenvolvidos: o método enzimático de Sanger e o método de degradação química de DNA, desenvolvido por Maxam e Gilbert (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012).

As amostras deste trabalho foram sequenciadas pelo método de Sanger. Este é um método enzimático que produz cópias de uma região alvo de DNA e utiliza como princípio a PCR, porém realiza-se a reação com apenas um oligonucleotídeo iniciador, senso ou antisenso. Além dos constituintes básicos da PCR, utiliza-se moléculas (bases nitrogenadas) de didesoxirribonucleosídeos trifosfatados (ddNTP). O ddNTP é uma molécula que não apresenta o grupamento hidroxílico no carbono 3', sendo assim, uma vez incorporado, impede a adição de outro nucleotídeo terminando o alongamento da cadeia. Cada base é marcada com um fluoróforo que permite a identificação quando submetidos a eletroforese capilar. Um feixe de laser rastreia o gel, excitando os marcadores que emitem luz em um comprimento de onda específico, conforme o fluoróforo utilizado. A emissão de luz é registrada e o padrão do espectro é analisado com ajuda de programas que constroem cromatogramas e convertem essa informação em uma sequência de bases. Como o resultado do sequenciamento produz uma sequência referente ao iniciador senso e outra ao antisenso, é necessário realizar o alinhamento e formar os *contigs*, que são segmentos de DNA sobrepostos que juntos representam uma região consenso do DNA. Finalmente, a sequência completa pode ser

checada em bancos de dados para identificar a identidade dos fragmentos sequenciados (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014; SAMBROOK; GREEN, 2012).

Os clones sequenciados no presente trabalho foram primeiramente analisados utilizando o programa Chromas Lite 2.1 (Technelysium, Austrália), que permite a observação do cromatograma. Com exceção da amostra 2, as amostras apresentaram bons resultados no cromatograma (valor de Phred maior ou igual a 30). A Figura 1 está representado parte do cromatograma senso das amostras 1 e 2. É possível observar que a amostra 2 apresenta picos variados no cromatograma e as bases lidas não apresentam boa qualidade, enquanto que na amostra 1 as bases lidas apresentam boa qualidade e os picos estão bem definidos.

**Figura 16: Cromatograma senso das amostras 1 e 2**



Fonte: Desenvolvido pela autora

Posteriormente, foi utilizado o programa online CAP3 Sequence Assembly Program da plataforma PRABI-Doua (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>), para criar os *contigs* de cada amostra. Os *contigs* foram verificados no programa BLAST

([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) para avaliar a porcentagem da sequência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento e a identidade máxima. Os *contigs* estão apresentados no quadro 1 e a figura 2 apresenta os resultados obtidos do alinhamento.

Os resultados do sequenciamento foram similares com os dados disponíveis no banco de dados para *T. vaginalis* e a sequência utilizada como referência para o desenho dos iniciadores apresentou melhor identidade.

Mesmo não sendo possível montar o *contig* da amostra 2, as sequências senso e antisenso foram alinhadas no programa separadamente e os resultados também foram similares com os dados disponíveis no banco de dados.

**Quadro 3: Contigs formados para as amostras sequenciadas**

Amostra	Contig
1	3'-TATTGTCGAACATTGGTCTTACCCTCAGTTCGCAAAGGCAGTCCTTGACAACACTACA ACAAATTCTTCTCCGAAGTCAAATCCAAAGTGAAGGTTTACTATGAGAACATTGACGC ACTCATGACGAACGAAGAAGGATACAACAACTCATTGAAATGGGAATGGTCGGTGA AAAGATGGGCTGTTTAAGCTAAATAAGGTATTTCCGAAGTTCATGTCTTCTCCAA CAACTCATCGTACATTTCAAATAAAAATTTAAAAAATGTCACTTTTTTGAAAAACGTTT TTATTTTCATGCAATGTTTTATTTCTGTGCCGTCTCAAGTATGCA - 5'
2	Não foi possível criar o <i>contig</i>
3	3'-TTACATTGACGCACTCATGACGAACGAAGAAGGRTACAACAACTCATTGAAATGG GNNTRGTCGGTGAAAAGATGGGTCAATTCAAATTGGACAAAATTTTCACCGAAGTTCA TGTCCTCTCCCTTGAACGTAAGGCTTCTTCGAAGTGCTCGAATGCGATTGGCTGCNTG ACCATCCGAAATGACACTTTTTGTCCGTTTGGTCAATGTTTCGTGTCTCGTGCCATAGTC GAYGAAAATACAGACAAACAGGTTATATATGAGTTTGAGACCAAGAATGGTGTAAC CGACCTGTCCGATTCAAAGACTCCGAGGGCA - 5'
4	3'-TTACATTGACGCACTCATGACGAACGAAGAAGGATACAACAAACYCATTGAAATGG GTTTAGTCGGTGAGAAGATGGGTCAATTCAAATTGGACAAAATTTTCACCGAAGTTCA TGTCCTCTCCAAGCGTAAGTACTGGGGTGTTAAAGAAGATGGTGAAATAGTTAAACAT TGCATGAAATAAAAAATTTTTATTCGAATTTGAATTAATAATGTGGGAATTCTTGGGAA CGTAAGGCTTCTTCGAAGTGCTCGAATGCGATTGGCTGCTTGACCATCCGAAATGACA CTTTTTGTCCGTTTGGTCAATGTTTCGTGTCTCGTGCCATAGTCGACGAAAATACAGACA AACAGGTTATATATGAGTTTGAGACCAAGAATGGTGTAACCTCGACCTGTCCGATTCAA AGACTCCGAGGGCA - 5'

Fonte: Desenvolvido pela autora.

**Figura 17: Resultado do alinhamento das amostras sequenciadas no programa BLAST**

<b>Amostra 1</b>						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Trichomonas vaginalis repeated DNA target for PCR identification</a>	392	392	68%	3e-105	98%	<a href="#">L23861.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_215350), partial mRNA</a>	350	350	65%	2e-92	95%	<a href="#">XM_00130106</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_353890), partial mRNA</a>	320	320	54%	2e-83	99%	<a href="#">XM_00127925</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_305840), partial mRNA</a>	305	305	54%	5e-79	97%	<a href="#">XM_00157900</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_121190), partial mRNA</a>	148	148	24%	8e-32	100%	<a href="#">XM_00127702</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_171390), partial mRNA</a>	148	148	24%	8e-32	100%	<a href="#">XM_00130258</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_010320), partial mRNA</a>	76.8	76.8	13%	4e-10	98%	<a href="#">XM_00131118</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_414260), partial mRNA</a>	63.9	63.9	10%	3e-06	100%	<a href="#">XM_00130987</a>

<b>Amostra 3</b>						
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Trichomonas vaginalis repeated DNA target for PCR identification</a>	337	469	99%	2e-88	97%	<a href="#">L23861.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_321260), partial mRNA</a>	219	219	42%	6e-53	96%	<a href="#">XM_001297477.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_305840), partial mRNA</a>	211	211	38%	1e-50	97%	<a href="#">XM_001579000.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_353890), partial mRNA</a>	204	204	38%	2e-48	96%	<a href="#">XM_001279254.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_383900), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001314228.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 conserved hypothetical protein (TVAG_403910), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001318622.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_065910), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001318522.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_148070), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001305633.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_112120), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001301060.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_033710), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001298418.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_381640), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001297845.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_017750), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001297812.1</a>

<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_024870), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001293053.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_435220), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001292652.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_148860), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001291945.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_310460), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001289999.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_155270), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001289067.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_468450), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001287474.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_154100), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001286937.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_540600), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001285046.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_602790), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001284831.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_604130), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001282923.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_540030), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001282857.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_066080), partial mRNA</a>	202	202	34%	6e-48	99%	<a href="#">XM_001282668.1</a>

#### Amostra 4

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Trichomonas vaginalis repeated DNA target for PCR identification</a>	324	506	95%	2e-84	96%	<a href="#">L23861.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_305840), partial mRNA</a>	228	228	43%	1e-55	89%	<a href="#">XM_001579000.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_353890), partial mRNA</a>	224	224	33%	2e-54	96%	<a href="#">XM_001279254.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_321260), partial mRNA</a>	222	222	32%	6e-54	96%	<a href="#">XM_001297477.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_383900), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001314228.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 conserved hypothetical protein (TVAG_403910), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001318622.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_065910), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001318522.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_148070), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001305633.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_112120), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001301060.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_033710), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001298418.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_381640), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001297845.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_017750), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001297812.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_024870), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001293053.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_435220), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001292652.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_148860), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001291945.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_310460), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001289999.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_155270), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001289067.1</a>

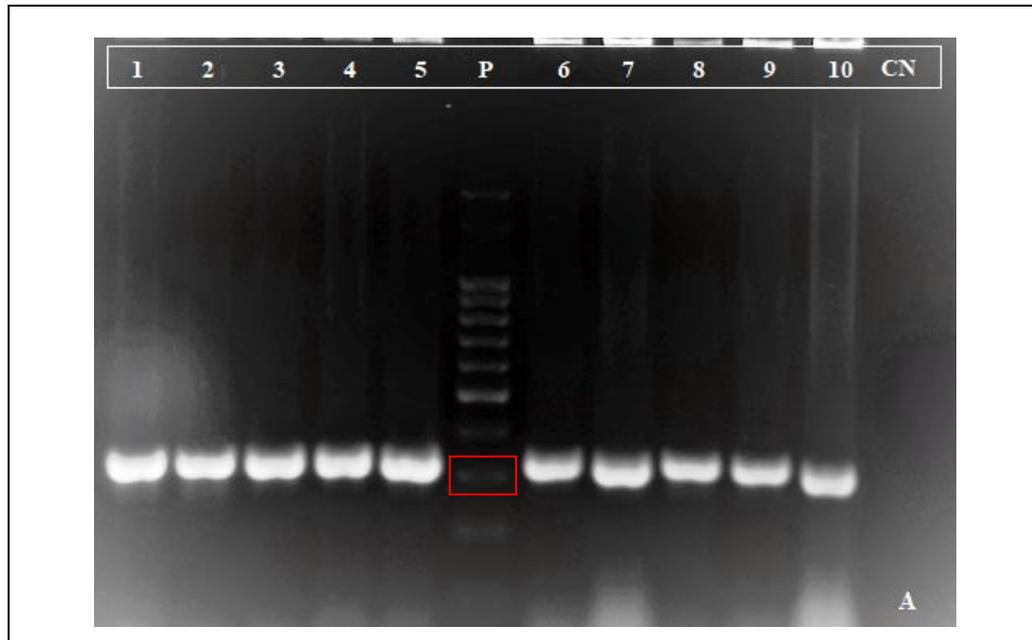
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_468450), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001287474.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_154100), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001286937.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_540600), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001285046.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_602790), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001284831.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_604130), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001282923.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_540030), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001282857.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_066080), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001282668.1</a>
<a href="#">Trichomonas vaginalis G3 hypothetical protein (TVAG_553660), partial mRNA</a>	206	206	26%	6e-49	100%	<a href="#">XM_001282663.1</a>

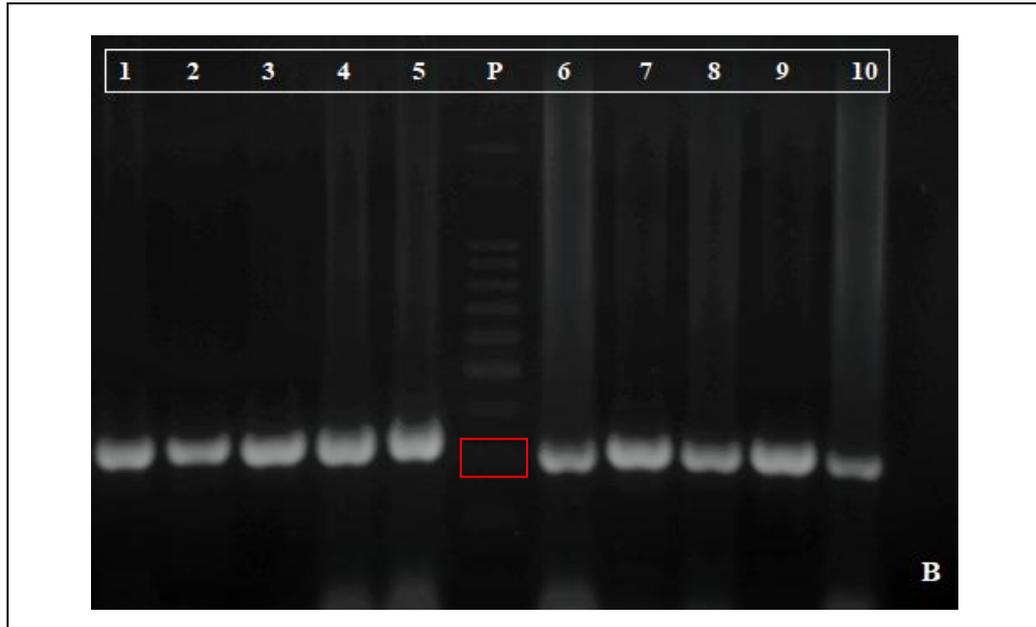
Legenda: Quadrado vermelho, sequencia selecionada para desenho do oligonucleotídeo iniciador. Fonte: Desenvolvido pela autora.

Foi realizada a clonagem dos fragmentos da PCR obtidos com o iniciador da literatura (300pb) (CRUCITTI, 2003; PILLAY; LEWIS; BALLAR, 2004; KENGNE et al., 1994).

Para a realização da etapa de transformação foram utilizados os DNAs 1 e 2 purificados, descritos neste item, seguindo o protocolo descrito no item 4.2.1. Após a etapa de transformação das bactérias, as colônias brancas observadas foram consideradas possíveis clones contendo o inserto. Dez (10) destas colônias foram submetidas à PCR seguindo o protocolo D apresentado na página 39. Verificou-se que 100% das colônias testadas continham o inserto clonado. A figura 16 ilustra a PCR para detecção o inserto, resultado da transformação das bactérias.

Figura 18: Fotografia do gel de agarose do fragmento de DNA clonado





Legenda: Quadrado vermelho, fragmento de 300pb do padrão de tamanho molecular. A: fragmento clonado da amostra 1, P, padrão de tamanho molecular de 100pb; 1 – 10, colônias selecionadas para confirmação da presença do inserto; CN, controle negativo. B: fragmento clonado da amostra 2, P, padrão de tamanho molecular de 100pb; 1 – 10, colônias selecionadas para confirmação da presença do inserto.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A tricomoníase é uma IST de grande importância mundial. No Brasil, a epidemiologia é variada devido à falta de estudos nacionais e por não se tratar de uma doença de notificação compulsória. Além disso, muitos casos de tricomoníase não são diagnosticados, pois a evolução clínica da doença, na grande maioria das vezes, é assintomática. Quando não tratada a tricomoníase pode evoluir para doença inflamatória pélvica, pode causar riscos para o recém-nascido e aumentar o risco de adquirir outras ISTs. Sendo assim, é importante que o diagnóstico seja realizado através de métodos sensíveis e específicos.

Afim de aprimorar o diagnóstico utilizado no laboratório na Divisão de Análises Clínicas do HU/UFSC este trabalho propôs a padronização de PCR para amostras biológicas e determinação de *kit* de extração para amostras de urina.

A necessidade de determinar o melhor *kit* para extração de DNA foi com o intuito de que este fosse rápido e prático na utilização da rotina laboratorial. A etapa de extração é limitante para a padronização e funcionamento da PCR, já que as amostras biológicas possuem inibidores de reação e estes impedem que a mesma ocorra, ou mesmo possibilite a amplificação de fragmentos inespecíficos. Os *kits* apresentaram resultados satisfatórios foram *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA) e *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN, EUA), o segundo *kit* foi escolhido para continuar as extrações.

Neste trabalho, iniciou-se a padronização da PCR com amostras de cultura a fim de clonar o fragmento de DNA para realização da padronização de amostras biológicas, mas devido ao tempo reduzido não foi possível finalizar a padronização. Encontrou-se o protocolo para amostras de cultura tanto para o iniciador selecionado da literatura como para o iniciador desenhado neste trabalho.

A clonagem do controle possibilitará material suficiente para o aprimoramento da reação e futura incorporação a PCR multiplex já utilizado para o diagnóstico de outras ISTs na Divisão de Análises Clínica do HU/UFSC possibilitando a redução no custo do protocolo por identificar mais de um microrganismo em uma mesma amostra.

Como perspectivas sugere-se a continuação da padronização para amostras biológicas, assim como a realização de protocolos de sensibilidade e especificidade da PCR, para ampliar os recursos diagnósticos na Divisão de Análises Clínicas do HU/UFSC.

Finalmente, os resultados deste trabalho podem contribuir para realização de futuros estudos epidemiológicos na região, com um método mais sensível comparado à microscopia a fresco, já que no estado de Santa Catarina, até a presente publicação deste trabalho, não foram encontrados dados epidemiológicos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A KINGSTON, M; BANSAL, D; CARLIN, e M. 'Shelf life' of *Trichomonas vaginalis*. **International Journal Of Std & Aids**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.28-29, 1 jan. 2003.

ALLSWORTH, J. E.; RATNER, J. A.; PEIPERT, J. F. Trichomoniasis and Other Sexually Transmitted Infections: Results From the 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. **Sexually Transmitted Diseases**, [s.l.], v. 36, n. 12, p.738-744, dez. 2009.

ALMEIDA, M. S. et al. Tricomoníase: prevalência no gênero feminino em Sergipe no biênio 2004-2005. **Ciência & Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1417-1421, jun. 2010.

AMBROZIO, C. L. et al. *Trichomonas vaginalis* PREVALENCE AND RISK FACTORS FOR WOMEN IN SOUTHERN BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 58, p.58-61, set. 2016.

KAZEMI B. et al. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by Urine PCR Analysis Compared to Wet Mount Microscopic Screening. **Journal Of Medical Sciences(faisalabad)**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.206-209, 1 mar. 2004. Science Alert.

BALI, L. El et al. Comparative Study of Seven Commercial Kits for Human DNA Extraction from Urine Samples Suitable for DNA Biomarker-Based Public Health Studies. **Journal Of Biomolecular Techniques: JBT**, [s.l.], p.96-110, dez. 2014. Association of Biomolecular Resource Facilities.

BANDEA, C. I. et al. Development of PCR Assays for Detection of *Trichomonas vaginalis* in Urine Specimens. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.1298-1300, 6 fev. 2013. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03101-12>.

BORCHARDT, K A; SMITH, R F. An evaluation of an InPouch™ TV culture method for diagnosing *Trichomonas vaginalis* infection. **Genitourin Med**, [s.i], v. 2, n. 67, p.149-152, nov. 1991

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT): Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST); 2015. Disponível em: <[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58357/miolo\\_pcdt\\_ist\\_22\\_06\\_2016\\_web\\_pdf\\_28406.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2015/58357/miolo_pcdt_ist_22_06_2016_web_pdf_28406.pdf)>. Acesso em: abril de 2018.

CARUSO, C. S.. **Clonagem, expressão e caracterização de proteínas recombinantes Xylella fastidiosa**. 2007. 187 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química Analítica, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

CDC, Parasites - Neglected Parasitic Infections (NPIs)- 2017. Atlanta, Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/npi/index.html> Acesso em: 16 de abril 2018.

CDC, **Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines** - 2015. Atlanta, v. 64, n. 18. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr6403.pdf>. Acesso em: 16 de abril 2018.

COLEMAN, J. S.; GAYDOS, C. A.; WITTER, Frank. Trichomonas vaginalis Vaginitis in Obstetrics and Gynecology Practice. **Obstetrical & Gynecological Survey**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.43-50, jan. 2013.

CRUCITTI, T. Comparison of culture and different PCR assays for detection of Trichomonas vaginalis in self collected vaginal swab specimens. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 79, n. 5, p.393-398, 1 out. 2003. BMJ.

DONNÉ, A. Animalcules observés dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme. **Comptes Rendus de L'académie Des Sciences**, [s.i.], v. 3, n. 40, p.385-386, set. 1836

EDWARDS, T. et al. Trichomonas vaginalis: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. **Critical Reviews In Microbiology**, [s.l.], p.1-12, 10 nov. 2014. Informa UK Limited.

GOLFETTO, L. **Detecção do HPV e Chlamydia trachomatis em amostras de cérvix uterina de mulheres da cidade da São Miguel do Oeste**. 2014. 141 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

GRAMA, D. F. et al. Inquérito preliminar de *Trichomonas vaginalis* em população feminina e fatores de risco associados em Unidade de Atendimento público no município de Uberlândia-MG. **Revista de Patologia Tropical**, S.i, v. 39, n. 2, p.91-103, jun. 2010.

GRAMA, D. F. et al. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* and risk factors in women treated at public health units in Brazil: a transversal study. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 107, n. 9, p.584-591, 22 jul. 2013.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of Tubal Infertility to History of Sexually Transmitted Diseases. **American Journal Of Epidemiology**, [s.l.], v. 137, n. 5, p.577-584, 1 mar. 1993.

GUENTHNER, P. C.; SECOR, W. E.; DEZZUTTI, C. S.. *Trichomonas vaginalis*-Induced Epithelial Monolayer Disruption and Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication: Implications for the Sexual Transmission of HIV-1. **Infection And Immunity**, [s.l.], v. 73, n. 7, p.4155-4160, 21 jun. 2005.

HIRT, R. P. et al. *Trichomonas vaginalis* Pathobiology. **Advances In Parasitology Volume 77**, [s.l.], p.87-140, 2011. Elsevier.

HIRT, R. P. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 89, n. 6, p.439-443, 21 maio 2013. BMJ.

HOBBS, M. M; SEÑA, A. C. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 89, n. 6, p.434-438, 30 abr. 2013.

IMA, M. C. L. de et al. Prevalência e fatores de risco independentes à tricomoníase em mulheres assistidas na atenção básica. **Acta Paulista de Enfermagem**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.331-337, 2013.

KENGNE, P et al. *Trichomonas vaginalis*: repeated DNA target for highly sensitive and specific polymerase chain reaction diagnosis. **Cell Mol. Biol.** 40:819–831 [[PubMed](#)]

KIRKCALDY, Robert D. et al. *Trichomonas vaginalis* Antimicrobial Drug Resistance in 6 US Cities, STD Surveillance Network, 2009–2010. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 18, n. 6, p.939-943, jun. 2012.

KISSINGER, P. *Trichomonas vaginalis*: a review of epidemiologic, clinical and treatment issues. **Bmc Infectious Diseases**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-8, 5 ago. 2015. Springer Nature.

KRIEGER, H.; KIMMING, P. Survival ability of *Trichomonas vaginalis* in mineral baths. **Gesundheitswesen**, [s.i], v. 57, n. 12, p.812–9, dez. 1995.

LAWING, L. F.; HEDGES, S. R.; SCHWEBKE, J. R. Detection of Trichomonosis in Vaginal and Urine Specimens from Women by Culture and PCR. **Journal Of Clinical Microbiology**, S.i, v. 38, n. 10, p.3585-3588, out. 2000.

LEMOS, P. A P.; GARCIA-ZAPATA, M. T. A. Aspects of trichomonas vaginalis' infection and diagnostic methods. **Acta Obstétrica e Ginecológica Portuguesa**, [s.i], v. 2, n. 8, p.152-162, fev. 2014.

LEMOS, P. A. P.; GARCIA-ZAP, M. T. A. The Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in HIV-Positive and Negative Patients in Referral Hospitals in Goiania, Goias, Brazil. **International Journal Of Tropical Medicine**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.24-27, 1 fev. 2010.

LÓPEZ-MONTEON, A. et al. Codetection of *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* by PCR in Urine Samples in a Low-Risk Population Attended in a Clinic First Level in Central Veracruz, Mexico. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2013, p.1-7, 2013. Hindawi Limited.

LUPPI, C. G. et al. Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, [s.l.], v. 14, n. 3, p.467-477, set. 2011.

MEITES, E. et al. A Review of Evidence-Based Care of Symptomatic Trichomoniasis and Asymptomatic *Trichomonas vaginalis* Infections. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 61, n. 8, p.837-848, 24 nov. 2015. Oxford University Press (OUP).

MEITES, E. Trichomoniasis. **Infectious Disease Clinics Of North America**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.755-764, dez. 2013.

MOODLEY, P. et al. Trichomonas vaginalis Is Associated with Pelvic Inflammatory Disease in Women Infected with Human Immunodeficiency Virus. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.519-522, fev. 2002.

NEWMAN, L. et al. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections in 2012 Based on Systematic Review and Global Reporting. **Plos One**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.0143304-0143314, 8 dez. 2015. Public Library of Science (PLoS).

OLIVEIRA, Renato dos Reis. **Padronização e comparação de técnicas em reação em cadeia por polimerase (PCR) para detecção de metapneumovírus humano em secreções respiratórias**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-05082008-151021/publico/renatodosoliveira.pdf>>. Acesso em: 17 out. 2018.

PEREIRA-NEVES, A.; RIBEIRO, K. C.; BENCHIMOL, M.. Pseudocysts in Trichomonads – New Insights. **Protist**, [s.l.], v. 154, n. 3-4, p.313-329, 2003.

PETRIN, D. et al. Clinical and Microbiological Aspects of Trichomonas vaginalis. **Clinical Microbiology Reviews**, Ottawa, v. 11, n. 2, p.300-317, abr. 1998.

PILLAY, A.; LEWIS, J.; BALLARD, R. C.. Evaluation of Xenostrip-Tv, a Rapid Diagnostic Test for Trichomonas vaginalis Infection. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.3853-3856, 1 ago. 2004.

POOLE, D. N.; MCCLELLAND, R. S. Global epidemiology of Trichomonas vaginalis. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 89, n. 6, p.418-422, 6 jun. 2013. BMJ

PROMEGA CORPORATION. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems. Tecchnical Manual. 2010

RIBEIRO, K. C.; MONTEIRO-LEAL, L. H; BENCHIMOL, M.. Contributions of the Axostyle and Flagella to Closed Mitosis in the Protists *Trichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. **The Journal Of Eukaryotic Microbiology**, [s.l.], v. 47, n. 5, p.481-492, set. 2000. Wiley-Blackwell.

RUMYANTSEVA, T. et al. Evaluation of the new AmpliSens multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, and *Trichomonas vaginalis*. **Apmis**, [s.l.], v. 123, n. 10, p.879-886, 24 ago. 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W.. Polymerase Chain Reaction. In: GREEN, Michael R; SAMBROOK, Joseph. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 4. ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

SCHEE, C. et al. Improved Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by PCR Using Vaginal Swabs and Urine Specimens Compared to Diagnosis by Wet Mount Microscopy, Culture, and Fluorescent Staining. **Journal Of Clinical Microbiology**, S.i, v. 37, n. 12, p.4127-4130, dez. 1999

SECOR, W. E. et al. Neglected Parasitic Infections in the United States: Trichomoniasis. **The American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, [s.l.], v. 90, n. 5, p.800-804, 7 maio 2014. American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

SILVA, L. C. F. et al. *Trichomonas vaginalis* and associated factors among women living with HIV/AIDS in Amazonas, Brazil. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 6, p.701-703, nov. 2013.

SILVER, B. J. et al. *Trichomonas vaginalis* as a Cause of Perinatal Morbidity. **Sexually Transmitted Diseases**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.369-376, jun. 2014.

ŠOBA, B.; SKVARČ, M.; MATIČIČ, M.. Trichomoniasis: a brief review of diagnostic methods and our experience with real-time PCR for detecting infection. **Acta Dermatovenerologica Alpina Pannonica Et Adriatica**, [s.l.], v. 24, n. 1, p.7-10, 15 mar. 2015. Association of Slovenian Dermatovenerologists

STONER, K. et al. Survival of *Trichomonas vaginalis* in wet preparation and on wet mount. **Sexually Transmitted Infections**, [s.l.], v. 89, n. 6, p.485-488, 20 abr. 2013. BMJ.

TAYOUN, A. N. A. et al. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis*. **Experimental And Molecular Pathology**, [s.l.], v. 98, n. 2, p.214-218, abr. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Infectious Diseases**; 2015. Disponível em: [http://www.who.int/gho/publications/mdgs-sdgs/MDGs-SDGs2015\\_chapter5.pdf?ua=1](http://www.who.int/gho/publications/mdgs-sdgs/MDGs-SDGs2015_chapter5.pdf?ua=1). Acesso em: 14 de março de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus**; 2013. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85343/9789241505840\\_eng.pdf;jsessionid=99CE6A101C8AC78DF52002B931D1E00E?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85343/9789241505840_eng.pdf;jsessionid=99CE6A101C8AC78DF52002B931D1E00E?sequence=1). Acesso em: abril de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Methods and results used by WHO to generate 2005 estimates**; 2005. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44735/1/9789241502450\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44735/1/9789241502450_eng.pdf). Acesso em: 14 março de 2018.

YAR, T. M. et al. Diagnosis of Trichomoniasis in Male Patients on Performing Nested Polymerase Chain Reaction. **Turkish Journal Of Parasitology**, [s.l.], v. 41, n. 3, p.130-134, 16 out. 2017

ZAHA, Arnaldo; FERREIRA, Henrique Bunselmeyer; PASSAGLIA, Luciane M. P.. **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda., 2014. 407 p.

**ANEXO A - Reagentes necessários para preparação das soluções de lise alcalina****1) Solução de lise alcalina I (mantém a osmolaridade do meio hipertônico para que a lise da parede celular seja menos brusca)**

50 mM glicose

25 mM Tris-HCl (pH 8,0)

10 mM EDTA (pH 8,0)

Preparar solução estoque lotes de 100mL, autoclavar e estocar a 4°C.

**2) Solução de lise alcalina II (5 ml) (preparar na hora – desnaturação do DNA cromossômico, proteínas e lise da parede celular).**

125 µL de NaOH em 5 ml de solução

250 µL de SDS 20% em 5 ml de solução

4, 625 mL de água

**3) Solução de lise alcalina III (5 ml) (reestabelecimento do pH neutro e favorecimento da remoção dos complexos).**

Acetato de Potássio 5M 60 ml

Ácido acético glacial 11,5 ml

28,5mL água

Estocar a solução a 4°C.