

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmácia**

Felipe de Rocco

**Avaliação de metodologias moleculares para diagnóstico das
infecções por *Neisseria gonorrhoeae* e por *Chlamydia trachomatis***

Florianópolis
2018

Felipe de Rocco

Avaliação de metodologias moleculares para diagnóstico das infecções por *Neisseria gonorrhoeae* e por *Chlamydia trachomatis*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia, área de concentração Análises Clínicas: Desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e monitoramento fisiopatológico e terapêutico.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Luiza Bazzo

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Rocco, Felipe
Avaliação de metodologias moleculares para
diagnóstico das infecções por *Neisseria gonorrhoeae* e
por *Chlamydia trachomatis* / Felipe de Rocco ;
orientadora, Maria Luiza Bazzo, 2018.
117 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Testes moleculares. 3. *Chlamydia trachomatis*. 4. *Neisseria gonorrhoeae*. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

**“AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS
MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DAS
INFECÇÕES POR *Neisseria gonorrhoeae* E POR
Chlamydia trachomatis”**

POR

Felipe de Rocco

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:

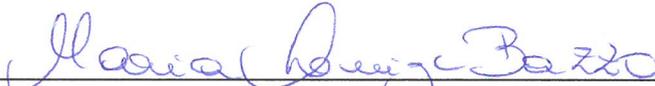
Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Thaís Cristine Marques Sincero (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Jussara Kasuko Palmeiro (UFPR – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – Orientador(a))

**Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 11 de outubro de 2018.

AGRADECIMENTOS

À professora orientadora Dra. Maria Luiza Bazzo pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pela orientação e exemplo de profissionalismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e demais órgãos: CAPES e Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis.

À farmacêutica-bioquímica Dra. Mara Cristina Scheffer, pelo auxílio, apoio técnico e científico e disponibilidade em corrigir o trabalho.

A todos os colegas e integrantes do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS), em especial aos colegas Clarice, Fernando, Luís Felipe, Marcos, e Mirela pelo convívio, incentivo e apoio técnico.

A minha noiva, Lisléia Golfetto, peça fundamental na execução deste trabalho, por toda ajuda e incentivo dado durante toda caminhada.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

RESUMO

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) representam um importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento. *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* juntas representam as ISTs de origem bacteriana mais prevalentes no mundo. O diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae* é realizado principalmente por cultura em meios seletivos, enquanto o diagnóstico da *C. trachomatis* é frequentemente realizado por imunofluorescência direta. Os métodos diagnósticos de ambas as infecções vêm sendo substituídos por metodologias moleculares de maior sensibilidade, como a captura híbrida e recentemente os testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAAT). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi padronizar uma PCR-Multiplex *in house* para a detecção simultânea de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, validar com uma metodologia aprovada pelo FDA Xpert CT/NG (Cepheid), e comparar com outra metodologia comercialmente disponíveis o Kit Multiplex Urethrite Plus (XGEN), além de determinar a prevalência da infecção por *N. gonorrhoeae* e por *C. trachomatis* em gestantes de alto risco em trabalho de parto prematuro, atendidas na emergência obstétrica do Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC). Foram analisadas 100 amostras, sendo uma de secreção ocular (de recém-nascido) e 99 de raspado endocervical que constituem um banco de amostras de gestantes atendidas na emergência obstétrica do HU/UFSC, no período de 2017 a 2018. O VPP e VPN da PCR multiplex *in house* foi de 91,7% e 61,4% para *C. trachomatis* e de 100% e 90,8% para *N. gonorrhoeae*. A sensibilidade para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi de 24,4% e 18,2%, respectivamente. A especificidade mostrou-se superior a 98,0% para ambos os alvos (98,2% para *C. trachomatis* e 100% para *N. gonorrhoeae*). A sensibilidade do kit XGEN Multi UP (XGEN) tanto para detecção de *C. trachomatis* quanto de *N. gonorrhoeae* foi de 35,6% e 63,6%, respectivamente. A especificidade foi de 98,2% para *C. trachomatis* e de 78,6% para *N. gonorrhoeae*. Os VPP e VPN foram de 94,1% e 65,0% para *C. trachomatis* e de 26,9% e 94,6% para *N. gonorrhoeae*. Além disso, o kit XGEN Multi UP (XGEN) apresentou 19,0% de resultados falso positivos para *N. gonorrhoeae*. A prevalência de infecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* pelo teste Xpert CT/NG foi de 45,5% e 10,1% respectivamente, com 3,0% de coinfeção. Somente infecção por *C. trachomatis* foi associada às gestantes com idade ≤ 24 anos ($p=0,038$), RC: 2,5 (IC 95%: 1,080- 5,729; $p=0,032$). Não foi observada

associação entre a presença da infecção por *N. gonorrhoeae* com a da infecção por *C. trachomatis*. Além disso, a utilização do teste Xpert CT/NG, permitiu associar o trabalho de parto prematuro com infecções por *C. trachomatis* (45,4% [45/99]) e *N. gonorrhoeae* (11,1% [11/99]) em aproximadamente 55% das gestantes de alto risco atendidas no HU/UFSC. Essas ISTs frequentemente assintomáticas, são consideradas fatores de risco associados à ocorrência de parto prematuro, aborto, gravidez ectópica, infertilidade (em ambos os sexos) e acometimento ocular em recém-nascidos, podendo levar a cegueira. Assim, o presente estudo corrobora a importância da implementação do rastreio para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em gestantes, utilizando um NAAT acurado, como uma medida decisiva para melhorar a saúde de mulheres e neonatos.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, rastreio, diagnóstico molecular, NAAT.

ABSTRACT

Sexually transmitted infections (STIs) represent a major public health problem, especially in developing countries. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* together represent the most prevalent bacterial STI in the world. The diagnosis of *N. gonorrhoeae* infection is mainly performed by culture in selective media, whereas the diagnosis of *C. trachomatis* is often performed by direct immunofluorescence. The diagnostic methods of both infections have been replaced by molecular methodologies with greater sensitivity, such as hybrid capture and recently nucleic acid amplification tests (NAATs). In this context, the aim of the present study was to standardize an in-house Multiplex PCR for the simultaneous detection of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*, to validate with a methodology approved by FDA - Xpert CT/NG (Cepheid), and to compare with another methodology commercially available - Urethritis Multiplex Plus (XGEN), besides, to determine the prevalence of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* infection in high-risk pregnant women of having a preterm labor, attended at the obstetric emergency of Professor Polydoro Ernani de São Thiago Hospital (HU/UFSC). A total of 100 samples were analyzed, one of ocular secretion (newborn) and 99 of endocervical scrapings which constitute a sample bank of pregnant women attended at the obstetric emergency of HU/UFSC, from 2017 to 2018. The PPV and NPV of in-house multiplex PCR were 91.7% and 61.4% for *C. trachomatis* and 100% and 90.8% for *N. gonorrhoeae*. The sensitivity for detection of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* was 24.4% and 18.2%, respectively. The specificity was higher than 98.0% for both targets (98.2% for *C. trachomatis* and 100% for *N. gonorrhoeae*). The sensitivity of the XGEN Multi UP kit (XGEN) for both *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* was 35.6% and 63.6%, respectively. The specificity was 98.2% for *C. trachomatis* and 78.6% for *N. gonorrhoeae*. The PPV and NPV were 94.1% and 65.0% for *C. trachomatis* and 26.9% and 94.6% for *N. gonorrhoeae*. In addition, the XGEN Multi UP kit (XGEN) presented 19.0% false positive results for *N. gonorrhoeae*. The prevalence of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* infection by the Xpert CT/NG test was 45.5% and 10.1%, respectively, with 3.0% of coinfection. Only *C. trachomatis* infection was associated with pregnant women aged ≤ 24 years ($p = 0.038$), CR: 2.5 (95% CI: 1.080-5.729, $p = 0.032$). It was not observed association between *N. gonorrhoeae* infection and *C. trachomatis* infection. In addition, the use of the Xpert CT/NG test allowed the association of preterm labor with *C. trachomatis* (45.4% [45/99]) and *N. gonorrhoeae* (11.1% [11/99])

infections in approximately 55% of the high-risk pregnant women attended at the HU/UFSC. These frequently asymptomatic STIs are considered risk factors associated with the occurrence of preterm birth, abortion, ectopic pregnancy, infertility (in both sexes) and ocular involvement in newborns, which may lead to blindness. Thus, the present study corroborates the importance of the implementation of screening for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* in pregnant women using an accurate NAAT as a decisive measure to improve the health of women and newborns.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, screening, molecular diagnosis, NAAT.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa dos 357 milhões de novos casos de ISTs curáveis (infecção por clamídia, gonorreia, sífilis e tricomoníase) em 2012	24
Figura 2. Infecções de transmissão sexual e proporção homem-mulher de sintomatologia	25
Figura 3. Taxa de casos de gonorreia reportados por ano nos Estados Unidos, 1941-2016.....	28
Figura 4. Infecção por <i>N. gonorrhoeae</i>	31
Figura 5. Experimento em orangotangos na expedição em Java	38
Figura 6. Manchete e figuras do primeiro relatório sobre clamídia de Halberstädter e von Prowazek em 1907.....	39
Figura 7. Patogenia da infecção por <i>C. trachomatis</i> no trato genital feminino.	43
Figura 8. Ciclo de vida bifásico de <i>C. trachomatis</i>	44
Figura 9. Sistema de diagnóstico GeneXpert®	62
Figura 10. Resultados fornecidos pelo software GeneXpert (Cepheid) para <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	64
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose representativa da PCR multiplex para detecção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	69
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose representativa da sensibilidade analítica da PCR-multiplex para <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	70
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose representativa sensibilidade analítica da PCR-multiplex para <i>N. gonorrhoeae</i>	72
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose representativa sensibilidade analítica da PCR-multiplex para <i>C. trachomatis</i>	73
Figura 15. Concordância das amostras positivas para <i>C. trachomatis</i> (A) e <i>N. gonorrhoeae</i> (B).	77
Figura 16. Comparação entre dois plasmídeos crípticos de <i>Chlamydia trachomatis</i> (pSW2, círculo interno e pSW3, círculo externo).....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Protocolos utilizados com o Kit QIAGEN® Multiplex Master Mix	60
Quadro 2. Protocolos utilizados com o kit GoTaq® Hot Start Polymerase60
Quadro 3. Possíveis resultados para o ensaio CT/NG65
Quadro 4. Reagentes que compõem o Kit XGEN Multi UP66
Quadro 5. Protocolo da qPCR com Kit XGEN Multi UP67
Quadro 6. Fluoróforos para a reação da q-PCR com Kit XGEN Multi UP67
Quadro 7. Exemplo de mapa de placa da qPCR com Kit XGEN Multi UP68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sorovares de <i>C. trachomatis</i> e sua associação com infecções em humanos.....	42
Tabela 2. Concordância entre PCR-multiplex <i>in house</i> e o kit Xpert CT/NG para detecção de <i>C. trachomatis</i>	74
Tabela 3. Concordância entre PCR-multiplex <i>in house</i> e o kit Xpert CT/NG para detecção de <i>N. gonorrhoeae</i>	74
Tabela 4. Concordância entre PCR-multiplex <i>in house</i> e o kit XGEN Multi UP para detecção de <i>C. trachomatis</i>	75
Tabela 5. Concordância entre PCR-multiplex <i>in house</i> e o kit XGEN Multi UP para detecção de <i>N. gonorrhoeae</i>	75
Tabela 6. Concordância entre os kits comerciais XGEN Multi UP e Xpert CT/NG para detecção de <i>C. trachomatis</i>	76
Tabela 7. Concordância entre os kits comerciais XGEN Multi UP e Xpert CT/NG para detecção de <i>N. gonorrhoeae</i>	76
Tabela 8. Descrição da média, mediana, moda e intervalo do cycle threshold (CT) para as amostras que foram positivas para <i>C. trachomatis</i>	77
Tabela 9. Descrição da média, mediana, moda e intervalo do cycle threshold (CT) para as amostras que foram positivas para <i>N. gonorrhoeae</i>	78
Tabela 10. Sensibilidade, especificidade e VPP e VPN do kit XGEN Multi UP e da PCR-multiplex <i>in house</i>	79
Tabela 11. Prevalência da infecção por <i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> e da coinfeção <i>C. trachomatis/N. gonorrhoeae</i> em gestantes de acordo com o teste utilizado	80
Tabela 12. Associação da infecção por <i>C. trachomatis</i> de acordo com a faixa etária	80
Tabela 13. Associação da infecção por <i>N. gonorrhoeae</i> em gestantes de acordo com a faixa etária.....	80
Tabela 14. Coinfecção por <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
BD	Becton, Dickinson and Company
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDS	sequencias de codificação, do inglês, <i>coding sequences</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
DCs	Células dendríticas, do inglês <i>dendritic cells</i>
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
EB	Corpo ou corpúsculo elementar, do inglês <i>elementay body</i>
ED	Ensaio de imunofluorescência direta
ELISA	Ensaio imunossorvente ligado à enzima
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HBP	Heptose-1,7-Bifosfato, do inglês, <i>heptose 1,7 bisphosphate</i>
HSH	Homens que fazem sexo com homens
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina 10, do inglês <i>Interleukin 10</i>
IL-1β	Interleucina 1 β , do inglês <i>Interleukin 1 β</i>
IL-6	Interleucina 6, do inglês <i>Interleukin 6</i>
IL-8	Interleucina 8, do inglês <i>Interleukin 8</i>
ISTs	Infecções sexualme□□e transmissíveis
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular Microbiologia e Sorologia
LOS	Lipo-oligossacarídeo, do inglês <i>lipooligosaccharide</i>
mCMV	Citomegalovírus de murino
MOMP	Maior proteína de membrana da <i>C. trachomatis</i>
NAATs	Testes de amplificação dos ácidos nucleicos, do inglês <i>nucleic acid amplification test</i>
NAH	<i>Non-amplified nucleic acid hybridization assays</i>
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
NOD	Sinalização de proteínas contendo domínio de oligomerização, do inglês, <i>oligomerization domain-containing protein</i>
nvCT	Nova variante sueca de <i>C. trachomatis</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
OMVs	Vesículas da membrana externa, do inglês, <i>outer membrane vesicles</i>
OPA	Proteína da opacidade
PCC	Controle da integridade da sonda, do inglês <i>Probe Check Control</i>
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
PMN	Polimorfonucleares
RB	Corpúsculo reticular, do inglês <i>reticulate body</i>
SAC	Controle da adequação da amostra, do inglês <i>Sample Adequacy Control</i>
SDA	Amplificação por deslocamento de cadeia, do inglês <i>strand displacement amplification</i>
SPC	Controle do processamento da amostra, do inglês <i>Sample Processing Control</i>
Th1	<i>T-helper 1</i>
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TMA	Amplificação mediada por transcrição, do inglês <i>transcription-mediated amplification</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
TRAF	Proteína de interação associado ao domínio Forkhead, do inglês, <i>interacting protein with forkhead associated domain</i>
USPSTF	<i>United States Preventive Services Task Force</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 <i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i>	27
2.1.1 Histórico	27
2.1.2 Agente etiológico	27
2.1.3 Epidemiologia.....	28
2.1.4 Infecção	30
2.1.5 Transmissão.....	32
2.1.6 Manifestações clínicas.....	33
2.1.7 Diagnóstico	35
2.2 <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	37
2.2.1 Histórico	37
2.2.2 Agente etiológico	39
2.2.3 Epidemiologia.....	40
2.2.4 Patogenia e imunidade.....	41
2.2.5 Transmissão.....	46
2.2.6 Manifestações clínicas.....	47
2.2.7 Diagnóstico	49
2.3 NAATs PARA O DIAGNÓSTICO DE <i>C. TRACHOMATIS</i> E <i>N. GONORRHOEAE</i>	51
3 OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4 METODOLOGIA	57
4.1 ASPECTOS ÉTICOS	57
4.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO	57
4.3 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO	57
4.4 AMOSTRAGEM	57
4.5 MEIO DE TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS	58
4.6 TESTES LABORATORIAIS.....	58
4.6.1 PCR multiplex para detecção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>....	58
4.6.1.1 Extração de DNA.....	58
4.6.1.2 PCR multiplex	58
4.6.1.3 Sensibilidade analítica	60

4.6.2 Xpert CT/NG Cepheid	61
4.6.2.1 Princípio do teste	61
4.6.2.2 Controle de qualidade	63
4.6.2.3 Interpretação dos resultados	63
4.6.3 Kit Multiplex Uretrite Plus (Kit XGEN Multi UP).....	65
4.6.3.1 Princípio do teste	66
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68
5 RESULTADOS	69
5.1 PADRONIZAÇÃO PCR MULTIPLEX <i>C. TRACHOMATIS</i> E <i>N. GONORRHOEAE</i>	69
5.2 CONCORDÂNCIA ENTRE AS METODOLOGIAS EMPREGADAS PCR-MULTIPLES IN HOUSE, XPERT CT/NG E XGEN MULTI UP PARA DETECÇÃO DE <i>C. TRACHOMATIS</i> E <i>N. GONORRHOEAE</i>	73
5.2.1 Concordância entre PCR-multiplex in house e o kit comercial XGEN Multi UP para detecção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	75
5.2.2 Concordância entre os kits comerciais Xpert CT/NG e XGEN Multi UP para detecção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>	75
5.2.3 Desempenho dos testes moleculares	76
5.3 SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN DA PCR-MULTIPLEX IN HOUSE PARA DETECÇÃO DE <i>C. TRACHOMATIS</i> E <i>N. GONORRHOEAE</i>	78
5.4 SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN DO KIT XGEN MULTI UP PARA DETECÇÃO DE <i>C. TRACHOMATIS</i> E <i>N. GONORRHOEAE</i>	78
5.5 PREVALÊNCIA DA INFECÇÃO POR <i>C. TRACHOMATIS</i> , <i>N. GONORRHOEAE</i> E DA COINFECÇÃO <i>C. TRACHOMATIS</i> E <i>N. GONORRHOEAE</i>	79
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) representam um importante problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (MAINA; KIMANI; ANZALA, 2016). Em 2012, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorreram mundialmente 357 milhões de novos casos de ISTs curáveis em homens e mulheres com idade entre 15-49 anos (**Figura 1**). *Chlamydia trachomatis* foi responsável por 130,8 milhões e *Neisseria gonorrhoeae* por 78,3 milhões dos novos casos. Ambas as infecções possuem taxas elevadas de prevalência entre adolescentes e adultos jovens com idade inferior a 25 anos, representando as ISTs de origem bacteriana mais prevalentes no mundo (WHO, 2015). A ausência de sintomas, especialmente em mulheres, é outra característica importante dessas ISTs. Aproximadamente 70% das infecções por clamídia e 50% das infecções gonocócicas são assintomáticas em mulheres (**Figura 2**), o que dificulta o diagnóstico precoce e tratamento (HOEBE et al., 2006). As infecções causadas por *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* possuem grande potencial para desenvolver morbidades que afetam de maneira irreversível o sistema reprodutor. Se não tratadas, essas infecções podem evoluir para doença inflamatória pélvica (DIP) e culminar em esterilidade, dor pélvica crônica e gravidez ectópica, por causar cicatrizes permanentes e obstrução nas tubas uterinas (EDWARDS; APICELLA 2004). A infertilidade pode ocorrer mesmo quando essas infecções são tratadas. Estima-se que quatro por cento das mulheres terão DIP em algum momento da sua vida e uma em cada oito mulheres com histórico de DIP possui dificuldade para engravidar (FORD; DECKER, 2016).

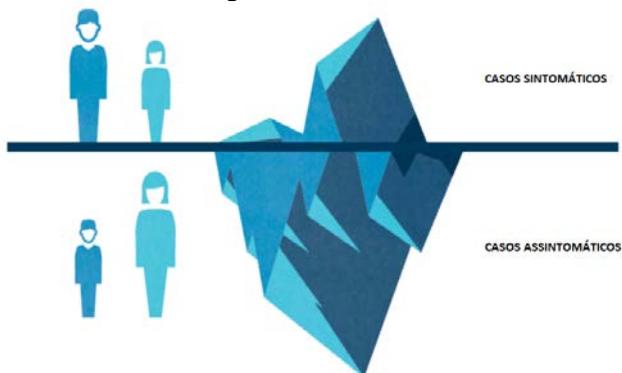
Na gestação, a gonorreia pode estar relacionada a um risco maior de prematuridade, ruptura prematura das membranas e amnionite. No recém-nascido, oftalmia e sepse são complicações relativamente frequentes. Infecção por *C. trachomatis* durante a gestação pode levar à ruptura prematura de membranas, parto pré-termo, endometrite puerperal e, ainda, conjuntivite e pneumonia no recém-nato (COSTA et al., 2010; WOODS, 2005, SILVEIRA et al., 2009). Mundialmente, a cada ano, cerca de quatro mil neonatos perdem a visão em decorrência de infecções oculares por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* adquiridas durante o parto. Adicionalmente, as infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* aumentam a chance de transmissão materno-fetal do HIV (ADACHI et al., 2015; GHYS et al., 1997).

Figura 1. Estimativa dos 357 milhões de novos casos de ISTs curáveis (infecção por clamídia, gonorreia, sífilis e tricomoníase) em 2012



A prevalência das ISTs curáveis varia de acordo com a região e o gênero. A região das Américas foi responsável por 17,9% (64,0 milhões) dessas infecções, enquanto a região do Sudeste da Ásia por quase 40,0% (142,0 milhões). **Fonte:** adaptado de WHO, 2016.

Figura 2. Infecções de transmissão sexual e proporção homem-mulher de sintomatologia



As mulheres são frequentemente portadoras de ISTs assintomáticas, enquanto os homens possuem maior probabilidade de desenvolver ISTs sintomáticas. **Fonte:** adaptado de WHO, 2016.

Devido às tendências sociais, demográficas e migratórias, o risco de aquisição das IST continuará a crescer dramaticamente, principalmente em países em desenvolvimento. Os custos socioeconômicos dessas infecções e suas complicações são substanciais, pois as ISTs estão entre as 10 principais razões de procura por atendimento médico na maioria dos países em desenvolvimento (WHO, 2007). Além disso, complicações em virtude de ISTs possuem impacto significativo na saúde reprodutiva e sexual, e apesar da semelhança entre o número de homens e mulheres com ISTs bacterianas, as complicações afetam desproporcionalmente as mulheres (WHO 2016).

Uma abordagem efetiva é a triagem de mulheres grávidas, independente dos sintomas, trazendo benefícios aos neonatos e prevenindo as reações adversas causadas pelas infecções durante e após a gestação (aborto espontâneo, morte fetal, prematuridade, baixo peso ao nascimento e endometriose pós-parto) (MEDLINE; DAVEVEY; KLAUSNER, 2016).

O diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae* é realizado principalmente por cultura em meios seletivos, enquanto o diagnóstico da *C. trachomatis* é frequentemente realizado por imunofluorescência direta. Os métodos diagnósticos de ambas as infecções vêm sendo substituídos por metodologias moleculares de maior sensibilidade, como

a captura híbrida e recentemente os testes de amplificação dos ácidos nucleicos *Nucleic Acid Amplification Tests* (NAAT).

Finalmente, o rastreio para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em gestantes fornece uma oportunidade para melhorar a saúde de mulheres e neonatos. Este estudo comparou diferentes NAATs para a detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* com o intuito de disponibilizar uma metodologia molecular eficaz e de baixo custo para gestantes que procuram a emergência obstétrica do HU-UFSC e aos demais usuários do Sistema Único de Saúde do hospital.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *NEISSERIA GONORRHOEAE*

2.1.1 Histórico

Neisseria gonorrhoeae é o agente etiológico da gonorreia, que tem a espécie humana como única hospedeira natural. Referências a essa infecção podem ser encontradas no Antigo Testamento da Bíblia (Lev.15:1-15-19), e em antigas literaturas chinesa, romana e grega (TAPSALL, 2005). O nome gonorreia origina-se do grego e foi Galeno (130-200 d.C.) que assim a denominou: gonorreia (gonos = espermatozoide + rhoia = corrimento), pela confusão do exsudato purulento com sêmen (PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000).

Hellier em 1872 foi o primeiro a observar a presença de microrganismos em secreções purulentas do trato genital. Bakei, Finkelstein e Watson-Cheyne também fizeram observações semelhantes à de Hellier. Entretanto, foi em 1879, na Universidade de Breslau (Alemanha) que o médico Albert Ludwing Sigismund Neisser observou pela primeira vez, o agente etiológico da gonorreia em exsudatos purulentos provenientes do trato genital e de conjuntivas (BENEDEK, 2005; NEISSER, 1879).

Neisser demonstrou a patogenicidade desse microrganismo em todos os casos clínicos de gonorreia ocular e uretral. Porém, foi somente em 1885 que o dermatologista França Ernest Bumm, isolou a bactéria, inoculou-a em voluntários e novamente a isolou em sangue de placenta humana, demonstrando a relação causal entre o patógeno e a infecção (BAILEY, 1937; KONEMAN; WINN, 2008; LEVINSON; JAWETZ, 2005; ORIEL, 1994).

2.1.2 Agente etiológico

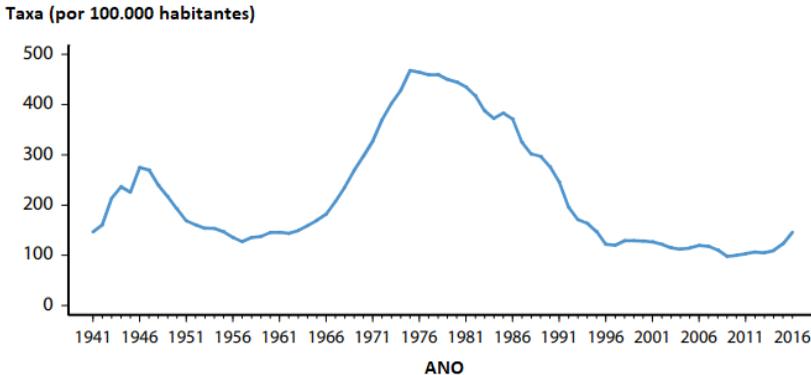
O gênero *Neisseria* possui 26 espécies não patogênicas a humanos e duas patogênicas: *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*. Entre as espécies não patogênicas destacam-se *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. sineria*, *N. flavescens*, *N. subflava* e *N. mucosa*, bactérias comensais do trato respiratório superior, que podem ser eventualmente encontradas no trato urogenital inferior (WHO, 2013a). *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis*, patógenos humanos exclusivos, são extremamente fastidiosos, demonstrando sensibilidade a fatores ambientais como: temperaturas extremas, dessecações e variações de pH (JORGENSEN et al., 2015).

O gênero *Neisseria* é composto por bactérias que se coram no Gram como cocos gram negativos isolados ou dispostos aos pares. São capnofílicas, produtoras da citocromo oxidase (exceto *N. elongata*), não formadoras de esporos e crescem melhor nas temperaturas entre 35-37°C. *N. gonorrhoeae* tem como característica se organizar aos pares com os lados adjacentes achatados (JORGENSEN et al., 2015; LEBER; HALL; LEBAR, 2006).

2.1.3 Epidemiologia

Entre 2005 e 2008, a OMS relatou um aumento de 21% na incidência mundial de infecções gonocócicas entre adultos. Nos Estados Unidos, a infecção por *N. gonorrhoeae* é a segunda IST de origem bacteriana mais comumente notificada. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC/EUA), em 2009, a taxa nacional de casos de gonorreia nos Estados Unidos atingiu um número historicamente baixo (98,1 casos por 100 mil habitantes). Em 2012 a taxa aumentou ligeiramente para 106,7 caos por 100 mil habitantes. Em 2016 a taxa foi de 145,8 casos por 100 mil habitantes, sinalizando aumento de 18,5% em relação ao ano anterior (CDC, 2017) (**Figura 3**).

Figura 3. Taxa de casos de gonorreia reportados por ano nos Estados Unidos, 1941-2016.



A coleta de dados para a gonorreia nos Estados Unidos iniciou em 1941, entretanto, a infecção por *N. gonorrhoeae* tornou-se nacionalmente notificável em 1944. **Fonte:** CDC, 2017.

No Brasil, estão disponíveis estudos locais que demonstram a variabilidade da prevalência da infecção por *N. gonorrhoeae* de acordo com o local e população estudada. A prevalência da infecção foi de 3,2% entre moradoras de comunidades carentes de Salvador em 2000 (CODES et al., 2006). Prevalência semelhante (3,0%) foi reportada entre mulheres usuárias de clínica de planejamento familiar em Campinas (FERNANDES et al., 2009). A prevalência entre usuários de clínicas de ISTs foi superior à observada na população em geral; em Manaus a prevalência em mulheres foi de 7,1% em 2008 (BENZAKEN et al., 2010); enquanto em estudo multicêntrico, a prevalência em homens chegou a 18,4% em 2010 (BARBOSA et al., 2010). Na população feminina jovem entre 16 e 23 anos, sem histórico prévio de verrugas genitais, alterações citológicas no colo do útero esplenectomia, distúrbios imunológicos e uso de imunossupressores, a prevalência caiu para 1,5% (PIAZZETTA et al., 2011). Um estudo multicêntrico em gestantes de seis cidades brasileiras (Manaus, Fortaleza, Goiânia, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre), também observou prevalência de 1,5% (JALIL et al., 2008). A infecção por *N. gonorrhoeae* tem uma alta carga de morbidade, com mais de 106 milhões de novos casos diagnosticados todos os anos em todo o mundo. De fato, essa morbidade vem aumentando exponencialmente, uma vez que os gonococos têm capacidade extraordinária de desenvolver resistências a todos os antimicrobianos introduzidos no tratamento (SUAY-GARCIA; PEREZ-GRACIA, 2018), o que torna o controle da gonorreia difícil na maioria das populações (PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000b). A emergência de resistência a múltiplos antimicrobianos, especialmente às cefalosporinas de espectro estendido, indica que a gonorreia tem o potencial de tornar-se intratável na atual e limitada realidade de opções de tratamento, principalmente em locais que possuem alta prevalência de infecções gonocócicas. A perda de opções de tratamentos eficazes e prontamente disponíveis pode levar a aumentos significativos na morbidade e mortalidade (UNEMO; RIO, DEL; SHAFER, 2016).

Apesar do rastreamento generalizado não ser recomendado, a triagem de mulheres jovens com idade inferior a 25 anos, é componente primordial para o controle da gonorreia nos Estados Unidos. Para mulheres sexualmente ativas, incluindo as gestantes, o *United States Preventive Services Task Force* (USPSTF) recomenda a triagem do gonococo apenas para aquelas em maior risco de infecção (mulheres com histórico de gonorreia ou outras ISTs, novos e/ou múltiplos parceiros sexuais, uso inconsistente de preservativos,

profissionais do sexo, usuárias de drogas e para aquelas que vivem em locais com altas taxas de prevalência da doença). O USPSTF não recomenda a triagem para homens e mulheres que estão sob baixo risco de infecção (CDC, 2014).

No Brasil, não existe um programa de rastreio para *N. gonorrhoeae*, a abordagem clínico-terapêutica é majoritariamente sintomática. O diagnóstico da uretrite gonocócica, pode ser realizado pela visualização de leucócitos polimorfonucleares com diplococos gram-negativos intracelulares na coloração de Gram, em amostras uretrais de homens sintomáticos. No entanto, em virtude da menor sensibilidade, uma coloração de Gram negativa não é suficiente para a exclusão da infecção em homens assintomáticos (BRASIL, 2015). Além disso, a coloração de Gram não é recomendada para amostras endocervicais, de faringe ou anorretais, pois essas amostras podem ter quantidades muito pequenas de gonococos, não detectáveis na bacterioscopia, e podem ainda apresentar outras espécies de diplococos gram negativos pertencentes à microbiota normal (WHO, 2013b).

2.1.4 Infecção

N. gonorrhoeae infecta células epiteliais colunares não ciliares e a adesão bacteriana no epitélio é mediada por estruturas denominadas *pili*, apêndices da bactéria que se estendem na superfície da célula. São importantes na ligação inicial do organismo à célula hospedeira permitindo a interação entre estruturas superficiais proeminentes e conferem maior resistência à fagocitose (**Figura 4**) (LEBER; HALL; LEBAR, 2006; QUILLIN; SEIFERT, 2018).

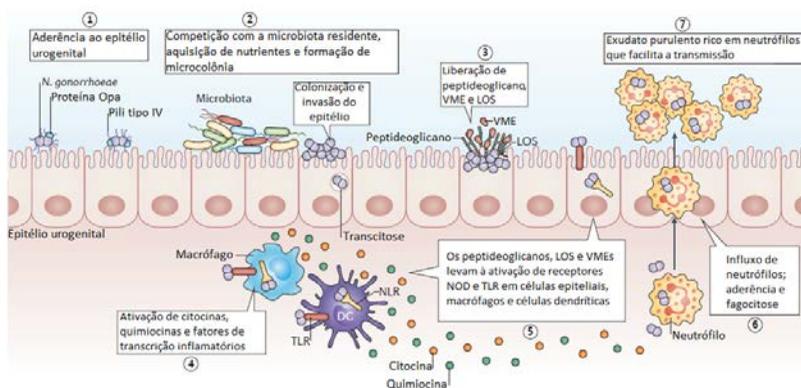
Após a aderência inicial, *N. gonorrhoeae* se replica, forma micro colônias e possivelmente biofilmes, competindo com a microbiota existente, e após colonizar o epitélio—está apta à invasão celular e posterior transcitose (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Ao aderir-se através do pili, outras proteínas de superfície, incluindo a Opa (proteína de opacidade), auxiliam na adesão dos gonococos às superfícies mucosas. A porina, localizada na membrana externa do gonococo, fornece o meio necessário para o transporte de ânions, além de entrada e saída de antimicrobianos (LEBER; HALL; LEBAR, 2006).

Durante os estágios iniciais da infecção, *N. gonorrhoeae* libera fragmentos de peptidoglicano, lipo-oligosacarídeo (do inglês *lipooligosaccharide* – LOS) e vesículas da membrana externa (do inglês, *outer membrane vesicles* – OMVs) que ativam receptores *Toll-like* (TLR) e a sinalização de proteínas contendo domínio de oligomerização

(do inglês, *oligomerization domain-containing protein* – NOD), em células epiteliais, macrófagos e células dendríticas (do inglês, *dendritic cells* – DCs) (QUILLIN; SEIFERT, 2018). A sinalização de NOD e TLR nessas células promove a ativação de fatores de transcrição inflamatória e a liberação de citocinas e quimiocinas. *N. gonorrhoeae* também libera heptose-1,7-bifosfato (do inglês, *heptose 1,7 bisphosphate* – HBP), que estimula a imunidade por meio da ativação da proteína de interação TRAF associada ao domínio *Forkhead* (do inglês, *TRAF interacting protein with forkhead associated domain* – TIFA).

A liberação das citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por essas vias inatas de sinalização imunológica criam gradientes de citocinas e quimiocinas que recrutam grandes números de leucócitos polimorfonucleares, ou neutrófilos, para o local da infecção, onde eles interagem e fagocitam a bactéria. O influxo de neutrófilos forma um exsudato purulento que então facilita a transmissão (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

Figura 4. Infecção por *N. gonorrhoeae*



A infecção inicial por *N. gonorrhoeae* à célula hospedeira é mediada pelo pili tipo IV, que se retrai e permite interações epiteliais com outras estruturas de superfície celular (PEARCE; BUCHANAN, 1978). Uma vez aderida à célula, *N. gonorrhoeae* se replica formando pequenas colônias (step 2), provavelmente biofilmes (HIGASHI et al., 2007; STEICHEN et al., 2011), competindo com a microbiota do hospedeiro. Nos estágios iniciais da infecção, *N. gonorrhoeae* libera fragmentos de peptidoglicano, lipopolissacarídeos (do inglês lipooligosaccharide – LOS) e vesículas da membrana externa (do inglês, outer membrane vesicles – OMVs) (KAPARAKIS et al.,

2010; MAVROGIORGOS et al., 2014; ZHOU et al., 2014) (*step 3*), que promovem a ativação do receptor Toll-like (TLR) e a ativação de proteínas com domínio de oligomerização (do inglês, oligomerization domain-containing protein – NOD) em macrófagos, células dendríticas (do inglês, dendritic cells – DCs) e células epiteliais (SINGLETON; MASSARI; WETZLER, 2005; KAPARAKIS et al., 2010). A ativação de NOD e TLR promove liberação de fatores de transcrição inflamatória e de citocinas e quimiocinas (*step 4*). *N. gonorrhoeae* também libera heptose-1,7-bifosfato (do inglês, heptose-1,7-bisphosphate – HBP), que ativa a imunidade através do estímulo da proteína de interação TRAF associado ao domínio Forkhead (do inglês, TRAF interacting protein with forkhead associated domain – TIFA) (*step 5*) (GAUDET et al., 2015). Essas vias de sinalização da imunidade inata promovem a liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que recrutam vários leucócitos polimorfonucleares (PMN) para promover a fagocitose da bactéria no local da infecção (*step 6*). Esse influxo de PMN cria um exsudato purulento que facilita a transmissão da infecção (*step 7*). Fonte: adaptado de QUILLIN; SEIFERT, 2018.

2.1.5 Transmissão

A gonorreia é uma das ISTs mais antigas e continua causando morbidade significativa entre os indivíduos sexualmente ativos (VERMA; SOOD, 2016). É transmitida quase que exclusivamente por contato sexual ou perinatal. Infecta principalmente as membranas mucosas do trato genital inferior e menos frequentemente as do reto, orofaringe e conjuntiva (BAUTISTA et al., 2016; HASSANZADEH; MARDANEH; MOTAMEDIFAR, 2013; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000b).

Um patógeno bem-sucedido deve ser capaz de ser transmitido eficientemente a novos hospedeiros e, como colonizador humano obrigatório, *N. gonorrhoeae* não tem capacidade de sobreviver fora do hospedeiro. A transmissão entre os hospedeiros depende de redes sexuais para disseminar o patógeno da população central de alto risco, na qual a maioria das infecções ocorre, para o grupo periférico de risco médio, que transmite *N. gonorrhoeae* de volta ao grupo principal e para seus parceiros. Populações de alto risco incluem indivíduos com múltiplos parceiros sexuais que não usam preservativos durante o intercursos sexual (CDC, 2014c; QUILLIN; SEIFERT, 2018b).

N. gonorrhoeae liga-se ao esperma humano e é facilmente transmitida de indivíduos infectados para os seus parceiros por meio do ejaculado, que contém um número elevado de bactérias. (COHEN et al.,

1994; HARVEY et al., 2000; JAMES-HOLMQUEST et al., 1974; QUILLIN; SEIFERT, 2018b). A ligação da bactéria ao esperma ocorre pela interação do receptor asialoglicoproteína (ASGP-R), uma proteína de membrana plasmática, ao LOS do gonococo (HARVEY et al., 2000).

A transmissão de mulheres para seus parceiros é menos evidente, uma vez que, a superfície do microrganismo deve estar isenta de ácido siálico para que se ligue e penetre com sucesso nas células epiteliais uretrais dos homens. Estudos sugerem que as sialidases bacterianas, secretadas pela microbiota cervicovaginal, devem primeiro promover a retirada do ácido siálico do LOS na superfície celular de *N. gonorrhoeae*, possibilitando a transmissão gonocócica de mulheres para homens (KETTERER et al., 2016).

Estruturas anatômicas permitem que a transmissão de ISTs para as mulheres durante as relações sexuais, ocorra de maneira biologicamente "mais eficiente" do que a transmissão de mulheres para homens. Quando as mulheres estão em posição de supino, as secreções genitais depositadas durante o coito tendem a formar uma piscina na cavidade vaginal, que normalmente banham o útero e colo do útero (local de infecções bacterianas, como gonorreia e clamídia). Embora essa tendência seja biologicamente vantajosa para fins de procriação, por fornecer aos espermatozoides um acesso prolongado ao trato reprodutivo feminino, também aumenta a intensidade e duração da exposição às infecções. Em contrapartida, o pênis deixa a vagina relativamente rápido após a relação sexual, como as secreções potencialmente infecciosas resultantes, são vulneráveis à secagem, perdem, portanto a viabilidade de infectar o parceiro sexual masculino (HOOK, 2012).

Outros fatores que aumentam o risco de aquisição de ISTs pelas mulheres em relação aos homens, são as mudanças relacionadas à idade e a variação hormonal, que alteram a quantidade de células epiteliais colunares endocervicais, fornecendo um número quantitativamente maior de células "alvo" propícias à infecção quando expostas a agentes de IST como *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (HOOK, 2012).

2.1.6 Manifestações clínicas

N. gonorrhoeae é um patógeno que infecta primariamente os epitélios urogenitais, embora a uretra e o colo do útero sirvam como sítios iniciais para infecção gonocócica em homens e mulheres, respectivamente. Infecções na conjuntiva, faringe e mucosa retal também são relatadas. A infecção gonocócica em células epiteliais,

diferentes e superficialmente distintas, leva a amplo espectro de manifestações clínicas da doença (EDWARDS; APICELLA, 2004).

Diferenças no desenvolvimento e origem embrionária das células que revestem os tratos urogenitais de homens e mulheres dotaram esses microambientes com diferentes moléculas de superfície que atuam como receptores e correceptores para *N. gonorrhoeae*, levando assim a diferenças nos mecanismos pelos qual o gonococo sobrevive nos diferentes ambientes urogenitais (EDWARDS; APICELLA, 2004; QUILLIN; SEIFERT, 2018b). Além disso, o dogma predominante nos estudos é que as infecções genitais femininas são predominantemente assintomáticas, enquanto as infecções genitais masculinas são, em grande parte, sintomáticas. Entretanto, esses dados são confrontados com estudos que demonstram que as infecções assintomáticas são comuns em ambos os sexos (JORDAN et al., 2017; XIONG et al., 2016).

A teoria que as infecções em mulheres são geralmente assintomáticas e nos homens são sintomáticos, baseia-se principalmente no fato de que os sintomas em homens (influxo de células do sistema imune e inflamação) são mais fáceis de diagnosticar devido à presença clássica de exsudato purulento no pênis e dor na micção. Por outro lado, as manifestações clínicas nas mulheres são mais propensas a passarem despercebidas. Os sintomas quando presentes, são frequentemente inespecíficos como corrimento vaginal (causado pelo influxo de neutrófilos), podendo ser confundido com vaginose bacteriana, infecção por fungos, variação hormonal ou variabilidade normal da secreção (HOOK, 2012). A infecção na mulher não promove inflamação no canal uretral e, portanto, é menos provável que seja dolorosa e sintomática. Além disso, na mulher a infecção é pleomórfica, variando desde a ausência completa de sintomas até a ocorrência de salpingite aguda, uma das causas mais comuns de infertilidade feminina no mundo (BAUTISTA et al., 2016; HASSANZADEH; MARDANEH; MOTAMEDIFAR, 2013; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000b).

Nos homens a gonorreia é causa comum de uretrite e pode levar a orquite (inchaço dos testículos associados com dor aguda escrotal). Nas mulheres a gonorreia causa cervicite, que é geralmente assintomática e pode levar à DIP e conseqüente infertilidade. Infecções extragenitais da faringe e do reto também são muitas vezes assintomáticas, sendo importante reservatórios para transmissão (GOIRE et al., 2014). São consideradas complicações importantes da infecção por gonococo a bacteriemia, a conjuntivite neonatal (transmissão vertical) e a epididimite aguda, além do aumento da susceptibilidade à infecção pelo

HIV (BAUTISTA et al., 2016; HASSANZADEH; MARDANEH; MOTAMEDIFAR, 2013; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000b).

A gonorreia geralmente produz exsudato purulento, mas os sinais e sintomas da doença podem estar ausentes ou ser indistinguíveis daqueles presentes na infecção por *C. trachomatis* e desta forma os testes laboratoriais são cruciais para um diagnóstico preciso e correto (VERMA; SOOD, 2016).

2.1.7 Diagnóstico

Historicamente, a gonorreia é diagnosticada pela análise do exsudato purulento na coloração de Gram, permitindo a detecção de diplococos gram-negativos fagocitados por leucócitos polimorfonucleares. Esse método ainda é comumente utilizado para diagnóstico de uretrite masculina, mais frequentemente em países em desenvolvimento e locais remotos.

Embora reconhecida clinicamente há séculos, a cultura para *N. gonorrhoeae*, particularmente de amostras originadas de sítios microbiológicos complexos, como o trato genital feminino, região anorretal e orofaringe, representa um desafio para os laboratórios de microbiologia devido à competição com bactérias comensais (microbiota local). Em meados de 1967, o desenvolvimento e a introdução na clínica de meios de cultura seletivos para *N. gonorrhoeae* permitiu melhorar o diagnóstico da infecção, particularmente para mulheres, uma vez que a positividade das culturas teve um aumento superior a 50% (MARTIN, J. E. J. et al., 1967; THAYER; MARTIN, 1964). A utilização desses meios forneceu ferramenta importante para revelar a alta prevalência da doença na população, estabelecendo as bases para o aumento da ênfase no controle da gonorreia pelo serviço de saúde pública dos EUA.

Embora os métodos de cultura gonocócica tenham sido bem descritos, existem certos desafios associados a esses métodos, entre eles podemos incluir a natureza fastidiosa do microrganismo, o que requer a escolha dos sítios anatômicos e coleta meticulosa de amostras, cuidados no transporte e utilização de técnicas ideais de cultura (VERMA; SOOD, 2016). Os métodos diagnósticos de ambas as infecções vêm sendo substituídos por metodologias moleculares de maior sensibilidade, como a captura híbrida e recentemente os testes de amplificação dos ácidos nucleicos (NAAT) (BRASIL, 2015).

A cultura, ainda considerada "padrão-ouro" para o diagnóstico da gonorreia, sob excelentes condições, tem sensibilidade que varia de 85%

a 95% em infecções agudas, caindo para 50% em casos assintomáticos ou crônicos (BROUWERS et al., 2005).

A utilização de meios seletivos foi a principal forma de diagnóstico da gonorreia até a década de 1990, quando os testes de amplificação de ácido nucleicos (NAATs) para o diagnóstico de gonorreia e clamídia começaram a ser utilizados, fornecendo métodos mais sensíveis e práticos (coleta de amostras) para o diagnóstico dessas infecções (CDC, 2014). Os NAATs, desde então, tornaram a triagem de ISTs mais fácil, permitindo a detecção de uma proporção maior de infecções e substituindo amplamente a cultura no diagnóstico da gonorreia em países desenvolvidos. Atualmente, o diagnóstico pode ser realizado utilizando uma variedade de ensaios de ácidos nucleicos, que identificam sequências específicas de *N. gonorrhoeae* (CDC, 2014c; QUILLIN; SEIFERT, 2018b). Os NAATs são mais sensíveis que a cultura para a detecção de infecções gonocócicas extragenitais, demonstrando maiores prevalências de infecção do que as previamente estimadas. Dados que levantam preocupações sobre a contribuição da gonorreia extragenital na evolução da resistência da bactéria aos antimicrobianos e conseqüentemente na morbidade. No entanto, a desvantagem dos NAATs é que ainda não permitem a avaliação da sensibilidade antimicrobiana, que depende do microrganismo viável em cultura (BACHMANN, L. H. et al., 2010; CDC, 2014b; HOOK; KIRKCALDY, 2018).

A detecção molecular do DNA ou RNA de *N. gonorrhoeae* é frequentemente realizada com testes comerciais disponíveis para a detecção simultânea de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*. As primeiras metodologias comercialmente disponibilizadas eram baseadas em ensaios de hibridização do material genético sem a tecnologia de amplificação (NAH, do inglês, *non-amplified nucleic acid hybridization assays*) como a captura híbrida. A metodologia NAH é baseada na hibridização de sondas específicas de DNA ou RNA ao DNA alvo e posterior amplificação do sinal de ligação. Contudo, os testes de NAH são substancialmente menos sensíveis que os NAATs e não são recomendados para o diagnóstico quando os NAATs estão disponíveis (WHO, 2013).

Os NAATs para detecção de *N. gonorrhoeae* são muito sensíveis e específicos, embora a especificidade possa variar consideravelmente de acordo com o teste utilizado. Além disso, uma das grandes vantagens dos NAATs é a utilização de amostras não invasivas (como urina para homens e *swabs* vaginais para mulheres), liberação rápida dos resultados, possibilidade de automação, dispensa necessidade de

microrganismo vivo para o diagnóstico, o que permite maior tolerância nos prazos entre a coleta e o transporte da amostra, uma vez que, em meio de conservação, a amostra pode ser armazenada por períodos relativamente longos. Entretanto, os NAATs possuem desvantagens como: elevado custo, falta de testes comerciais aprovados para detecção de *N. gonorrhoeae* em amostras extragenitais, não informam sensibilidade antimicrobiana, alguns ensaios possuem especificidade abaixo do ideal ($< 99,0\%$)(CDC, 2014) e não são recomendados para testes de cura (WHO, 2013b).

Embora que ainda não haja NAATs licenciados para utilização em amostras de anorretal e de faringe, existem fortes evidências que eles são mais sensíveis do que a cultura nesse tipo de amostra (BACHMANN et al., 2010; SCHACHTER et al., 2008). Em laboratórios que desejam oferecer um NAAT para amostras extragenitais, recomenda-se a validação dos resultados para garantir a confiabilidade do seu uso. Dessa forma, sugere-se a testagem das amostras com outro NAAT, preferencialmente dirigido a um alvo diferente do primeiro NAAT para evitar resultados falso-positivos, principalmente pelo fato que essas amostras podem apresentar reação cruzada com espécies comensais de *Neisseria* sp. ou *N. meningitidis* (WHO,2013).

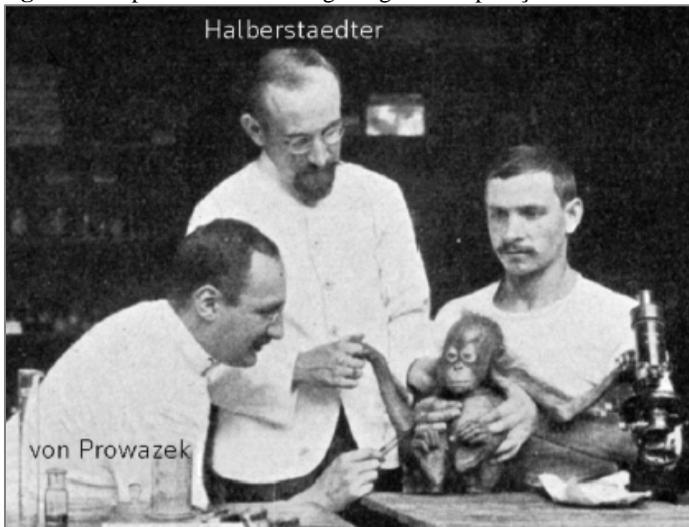
2.2 CHLAMYDIA TRACHOMATIS

2.2.1 Histórico

Em 1907, Ludwig Halberstaedter e Stanislau von Prowazek, descreveram pela primeira vez, um gênero bacteriano intracelular de "*Chlamydia*" (HALBERSTAEDTER e von PROWAZEK, 1907, apud POSPISCHIL, 2009). Ambos os cientistas eram membros de uma expedição à Batávia, Java (uma antiga colônia holandesa) entre 1905-1906, liderados por Albert Neisser. O objetivo da expedição era estudar o possível tratamento da sífilis por um composto arsênico orgânico recém-sintetizado (arsfenamina), descoberto por Sahachiro Hata no laboratório de Paul Ehrlich's na empresa Bayer, além de estudar a transmissão da sífilis de Macacos para os homens. Contudo, Ludwig Halberstaedter e Stanislau von Prowazek infectaram orangotangos com raspagens conjuntivais de um paciente com tracoma (**Figura 5**), e posteriormente, observaram granulomas característicos de tracoma na conjuntiva dos orangotangos. A investigação microscópica de esfregaços da conjuntiva corados por Giemsa revelou inclusões

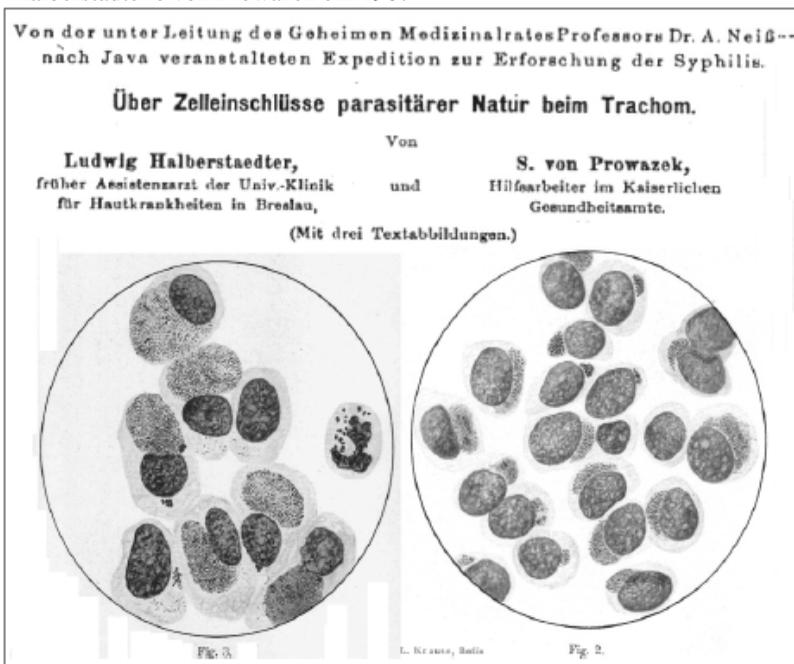
intracitoplasmáticas contendo numerosas pequenas partículas, posteriormente reconhecidas como corpos elementares e reticulares, o verdadeiro agente causal da doença (**Figura 6**). As partículas foram chamadas Chlamydozoa, que significa "capa e animal" (do inglês, *cloak and animal*). Pouco depois, inclusões semelhantes às encontradas no tracoma de orangotangos por Alberstaedter e von Prowazek, foram observadas em células conjuntivais de recém-nascidos europeus com oftalmia não gonocócica e em células cervicais de suas mães, estabelecendo-se que o agente causador de infecções genitais não gonocócicas foi o mesmo agente do tracoma encontrado em 1907 (HALBERSTAEDTER e von PROWAZEK, 1907; NICOLLE et al., 1912; THYGESON, 1934; *apud* POSPISCHIL, 2009). No entanto, os agentes infecciosos não eram retidos por filtros bacterianos utilizados na época, o que levou tanto à noção equivocada de que o patógeno era um vírus, quanto à confusão em relação ao status taxonômico das clamídias, que perdurou por muitos anos. O conhecimento sobre clamídia como causa de IST é muito mais recente do que no tracoma e foi bem descrito por John Oriel e Geoff Ridgway (TAYLOR-ROBINSON, 1982).

Figura 5. Experimento em orangotangos na expedição em Java



Da esquerda para a direita: Stanislaus von Prowazek, Ludwig Halberstädter e um cuidador de animais realizando a infecção de orangotangos com raspagens conjuntivais de um paciente com tracoma. **Fonte:**(POSPISCHIL, 2009)

Figura 6. Manchete e figuras do primeiro relatório sobre clamídia de Halberstädter e von Prowazek em 1907



Fonte: POSPISCHIL, 2009

2.2.2 Agente etiológico

As clamídias são bactérias patogênicas intracelulares obrigatórias, gram-negativas e aeróbicas. Devido a sua incapacidade de sintetizar ATP (trifosfato de adenosina), precisam da energia da célula hospedeira para se replicar (BACHMANN, N.; POLKINGHORNE; TIMMS, 2014; MANAVI, 2006).

As clamídias foram classificadas na ordem Chlamydiales, família Chlamydiaceae, dentro de um único gênero Chlamydia, contendo 11 espécies patogênicas para humanos e animais. *C. trachomatis* e *C. pneumoniae* são as principais espécies patogênicas em humanos (ELWELL; MIRRASHIDI; ENGEL, 2016), enquanto, outras espécies como *C. pecorum*, *C. abortus* e *C. felis* raramente são associadas a infecções em humanos (JORGENSEN et al., 2015). São caracterizadas por um ciclo de desenvolvimento e grupo antigênico comum, mas

apresentam diferenças fenotípicas e na patogenia (CHOROSZY-KROL et al., 2012).

2.2.3 Epidemiologia

C. trachomatis é a principal causa mundial de IST de origem bacteriana. A maioria das infecções é observada na região do Pacífico Ocidental e na região das Américas. A infecção por *C. trachomatis* é a mais comum entre as infecções de notificação compulsória nos Estados Unidos. Em 2014, um total de 1.441.789 milhão de casos de infecções por *C. trachomatis* foram reportadas ao CDC. Em 2015, a prevalência da infecção foi superior a 1,5 milhão de casos, um aumento de 5,9% em relação ao ano anterior (452,2 para 478,8 casos por 100.000 habitantes) (CDC, 2015). Durante o período 2015-2016, as taxas de clamídia aumentaram em todas as regiões dos EUA, sendo que em 2016 a prevalência da infecção correspondeu a uma taxa de 497,3 casos por 100.000 habitantes, um aumento de 4,7% em comparação a 2015 (CDC, 2017). Em 2017, foi reportado mais de 1,7 milhão de casos de clamídia, o que representou uma taxa de 529 casos por 100.000 habitantes. Entretanto, o número real de infecções provavelmente excede três milhões por ano, porque a maioria das infecções por clamídia é assintomática e conseqüentemente não detectada. O *National Health and Nutrition Examination Survey* dos Estados Unidos (NHANES) avalia que cerca de 1,8 milhões de pessoas na faixa etária entre 14-39 estão infectados por clamídia nos Estados Unidos (CDC, 2015).

Estima-se que uma em cada vinte mulheres jovens, sexualmente ativas, com idade entre 14-24 anos está infectada por clamídia (TORRONE et al., 2014). As taxas de infecção por *C. trachomatis* são mais altas entre adolescentes e mulheres jovens, sendo essa a população alvo do rastreio para a infecção. As taxas dos casos notificados entre os homens são geralmente mais baixas que entre as mulheres, contudo, a maior disponibilidade de testes utilizando amostras de urina e extragenitais resultaram no aumento do número de homens testados e diagnosticados com infecção por *C. trachomatis* (CDC, 2017).

A prevalência de infecção por clamídia também varia de acordo com a raça; segundo um relatório dos EUA em 2015, a taxa de casos notificados entre negros foi 5,9 vezes maior que a taxa entre brancos (CDC, 2017). A prevalência de infecção por clamídia entre jovens negras, não hispânicas, sexualmente ativas com idade entre 14 a 24 anos foi de 13,5%, em comparação com 1,8% entre jovens brancas e não hispânicas (TORRONE et al., 2014).

No Brasil, os dados disponíveis são relativos a estudos isolados, que relataram prevalência heterogênea de infecção por *C. trachomatis*, de acordo com a população estudada e com a metodologia diagnóstica empregada. As maiores prevalências foram observadas em mulheres jovens (13,5%) (FERNANDES et al., 2009) e em profissionais do sexo (20,5%) (BALDIN-DAL POGETTO; SILVA; PARADA, 2011). Em um estudo que avaliou infecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em gestantes de seis cidades brasileiras (Manaus, Fortaleza, Goiânia, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre), foi encontrada prevalência de 9,4% para clamídia e de 1,5% para gonorreia, sendo observada infecção simultânea por *N. gonorrhoea* em 10% das gestantes com infecção por clamídia (JALIL et al., 200). Infecções por clamídia são motivos de preocupação em nível de saúde pública mundialmente (WIESENFELD, 2017).

2.2.4 Patogenia e imunidade

C. trachomatis é um patógeno intracelular obrigatório, responsável pelo tracoma e diversas ISTs. Existem 18 principais sorovares, baseados na análise do sequenciamento do DNA e na imunotipagem da maior proteína de membrana de *C. trachomatis* (MOMP). Os sorovares A, B, Ba e C causam tracoma, uma das principais causas de cegueira no mundo; os sorovares D ao K causam principalmente ISTs, e os sorovares L1 ao L3 causam linfogranuloma venéreo (Tabela 1) (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005).

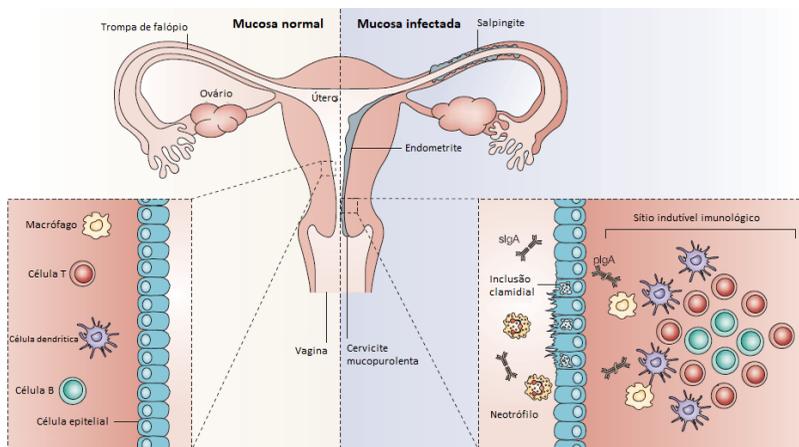
Tabela 1. Sorovares de *C. trachomatis* e sua associação com infecções em humanos

Sorovares	Tipo de infecção	Transmissão	Patologia
A, B, Ba e C	Tracoma ocular	Mão para olhos e fômites	Conjuntivite, cicatrização da conjuntiva e córnea
D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, e K	Infecções oculogenital	Sexual e perinatal	Cervicites, uretrites, endometrites, DIP, infertilidade tubária, gravidez ectópica, conjuntivite neonatal e pneumonia na infância
L1, L2 e L3	Linfogranuloma venéreo	Sexual	Invasão submucosa e linfonodal, com granulomas necrotizantes e fibrose

Fonte: (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005)

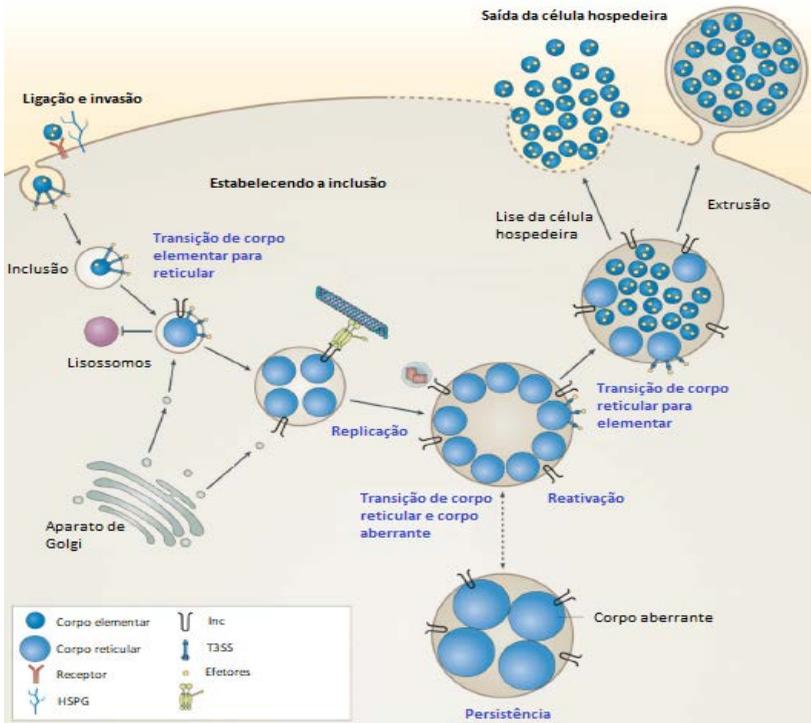
C. trachomatis normalmente infecta o epitélio de revestimento do canal endocervical, que se apresenta como uma camada única de células colunares produtoras de muco (**Figura 7**) (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005). Uma vez no interior das células epiteliais, reside em um vacúolo especializado e tem ciclo de desenvolvimento bifásico que ocorre com coexistência de duas formas morfológicamente distintas (HACKSTADT et al., 1997). Uma forma infecciosa, mas metabolicamente inativa: o corpo ou corpúsculo elementar (do inglês *elementary body* - EB) e outra forma metabolicamente ativa, mas não infecciosa: o corpo ou corpúsculo reticular (do inglês *reticulate body*-RB). Após a internalização em células epiteliais da mucosa, os EBs são circundados por uma membrana endossomal, formando uma inclusão e criando um nicho propício para a replicação de *C. trachomatis* (FIELDS; HACKSTADT, 2002). Dentro da inclusão, os EBs se transformam em RBs que se dividem por fissão binária, dentro de 40-48 horas, e novamente os RBs se transformam em EBs infecciosos, que serão liberados do vacúolo de inclusão para infectar células vizinhas (**Figura 8**). Quando expostos a inibidores de crescimento, como o interferon- γ , *C. trachomatis* adquire uma forma não replicante, persistente, que após a remoção do inibidor volta à forma infecciosa (EB) (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005).

Figura 7. Patogenia da infecção por *C. trachomatis* no trato genital feminino



C. trachomatis inicia a infecção no trato genital feminino nas células epiteliais colunares do colo uterino, causando pouco ou nenhum sintoma clínico. A bactéria pode ascender para infectar o endométrio e as tubas uterinas, causando DIP, inflamação das tubas uterinas (também conhecida como salpingite), cicatrização e oclusão, que podem levar a infertilidade ou gravidez ectópica. A reação inflamatória é caracterizada por um influxo de macrófagos e neutrófilos e a formação de sítios indutivos imunológicos na submucosa. Esses sítios indutivos, contêm células B, células T, células dendríticas e macrófagos que coordenam o início de uma resposta imune adquirida, incluindo a implantação de uma resposta secretora mediada por IgA. Fonte: (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005).

Figura 8. Ciclo de vida bifásico de *C. trachomatis*



A ligação dos EBs às células hospedeiras é iniciada pela formação de uma ponte trimolecular entre as adesinas bacterianas, os receptores do hospedeiro e os proteoglicanos do sulfato de heparano do hospedeiro (HSPGs). Em seguida, os efetores pré-sintetizados do sistema de secreção do tipo III (T3SS) são injetados na célula hospedeira, alguns dos quais iniciam rearranjos do citoesqueleto para facilitar a internalização e/ou iniciar a sinalização mitogênica para estabelecer um estado anti-apoptótico. Os EBs sofrem endocitose em um compartimento ligado à membrana, conhecido como inclusão, que se dissocia rapidamente da via endolisossomal canônica. A síntese proteica bacteriana começa, os EBs convertem-se em corpos reticulados e as proteínas de membrana de inclusão recém-secretadas (Incs) promovem a aquisição de nutrientes, redirecionando as vesículas exocíticas que estão em trânsito do aparelho de Golgi para a membrana plasmática. A inclusão nascente é transportada, provavelmente por um Inc, ao longo de microtúbulos para o centro de organização dos microtúbulos (MTOC) ou centrosossoma. Durante o meio do ciclo, os EBs replicam-se exponencialmente e secretam substâncias que modulam processos na célula hospedeira. Sob condições de estresse, os RB entram em um estado persistente e fazem a transição para corpos aberrantes aumentados. As bactérias podem ser reativadas após a remoção do estresse. Durante os últimos estágios

da infecção, RBs secretam substâncias efetoras do ciclo tardio e sintetizam substâncias efetoras dos EBs antes de se diferenciarem para EBs novamente. Os EBs deixam a célula hospedeira por lise ou extrusão **Fonte:** (ELWELL; MIRRASHIDI; ENGEL, 2016)

A resposta imune frente às infecções por *C. trachomatis* varia de acordo com cada indivíduo. Em 20-54% dos casos as infecções podem se auto resolver em até um ano (MORRISON et al., 2000). No entanto, 23-30% dos indivíduos, podem tornar-se repetidamente infectados, duas ou mais vezes, nos 12 meses após o diagnóstico inicial e tratamento (HOSENFELD et al., 2009; WALKER et al., 2012). Estudos com modelos murinos têm reportado que o controle ou resolução da infecção genital por clamídia depende da produção de INF- γ por células T *helper 1* (Th1) (MORRISON; FEILZER; TUMAS, 1995; MORRISON, S. G. et al., 2000), entretanto, a maioria dos pacientes não resolve espontaneamente suas infecções (GEISLER et al., 2008, 2013; MOLANO et al., 2005). Em modelos murinos, foi demonstrado que o tratamento com antimicrobianos pode suprimir a resposta imune protetora do hospedeiro (SU et al., 1999). Esses resultados foram referidos como a hipótese da imunidade aprisionada (BRUNHAM; REKART, 2008), na qual sugere-se que o tratamento precoce da infecção por *C. trachomatis* aumenta a suscetibilidade da população a reinfecções (BRUNHAM et al., 2005), presumivelmente por interferir no desenvolvimento da resposta imune protetora. Além dos efeitos parasita e hospedeiro, foi proposto recentemente que as bactérias da microbiota vaginal podem ter um papel fundamental na resolução de infecções por *C. trachomatis*. Antimicrobianos utilizados no tratamento de clamídia podem interferir no equilíbrio bacteriano saudável do trato genital (MA; FORNEY; RAVEL, 2012; MAYER et al., 2015), causando especificamente uma diminuição na prevalência de *Lactobacillus* spp. comensais, que possuem efeitos inibitórios sobre bactérias patogênicas (BOSKEY et al., 2001; GONG et al., 2014).

Mulheres que adquirem novas infecções, são incapazes de combater a infecção ou são mais propensas a desenvolver DIP, infertilidade e gravidez ectópica (MENON et al., 2015; NESS et al., 2008; OAKESHOTT et al., 2010). Acredita-se que a progressão para essas sequelas, seja o resultado da resposta inflamatória frente à infecção, que promove ruptura tecidual, fibrose e cicatrização (DARVILLE, 2013; DARVILLE; HILTKE, 2010). A resposta imune adaptativa é caracterizada pela produção de numerosas células T

infiltrando o local da infecção. Uma das mais importantes respostas imunes celulares no desenvolvimento da imunidade protetora na infecção por *C. trachomatis* é caracterizada por células T CD4+ e CD8+ secretoras de INF- γ . Contudo, após a reinfeção ou infecção crônica, a liberação de quimiocinas pelas células do hospedeiro pode levar ao recrutamento de células específicas do sistema imune para ampliar a resposta inflamatória. A liberação de proteases, fatores de coagulação e de crescimento tecidual por células infectadas resulta no dano tecidual e cicatrização (DARVILLE; HILTKE, 2010), que são o resultado da resposta imune tardia por intermédio de células Th1 e Th17 (48). Expressões elevadas de citocinas do tipo Th2, como a interleucina-10 (IL-10), IL-1, IL-6, IL4 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α e Th1), também foram associados com a doença e com aumento do risco de sequelas no tracoma e nas infecções urogenitais por *C. trachomatis* (DARVILLE et al., 2003; MOZZATO-CHAMAY et al., 2000). Esses achados reforçam a teoria do "paradigma imunológico para a patogênese", no qual a resposta imune mediada por células T, necessárias para a defesa do hospedeiro, também pode levar ao dano tecidual (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005). As razões pelas quais *C. trachomatis* pode causar infecções prolongadas (meses a anos) e evadir-se da resposta imune, não são bem compreendidas, mas sugerem uma série de sofisticados mecanismos de adaptação e /ou evasão. Existem muitos fatores que influenciam na infecção inicial por *C. trachomatis* e no seu progresso, incluindo a resposta imune do hospedeiro, alterações hormonais ao longo do ciclo menstrual, comunidades bacterianas colonizando o trato genital, bem como coinfeções com outras ISTs (ZIKLO et al., 2016).

2.2.5 Transmissão

O período de incubação da infecção por *C. trachomatis* varia de sete a 21 dias após a exposição (LANE; DECKER, 2016). A taxa de transmissão de infecções genitais por *C. trachomatis* de homens para mulheres e vice-versa é de aproximadamente 70%, o que indica uma transmissão eficiente entre parceiros sexuais (QUINN et al., 1996). Estima-se que 60% a 70% das crianças expostas a *C. trachomatis* durante o parto normal adquirem conjuntivite, a manifestação clínica mais frequente da infecção em neonatos (LANE; DECKER, 2016).

Fatores de risco para infecção por clamídia incluem novos parceiros sexuais, mais de um parceiro sexual, relato anterior de infecção por clamídia ou outra IST e uso inconsistente de preservativo,

comportamentos frequentes entre pessoas mais jovens (WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, 2015). Ectopia cervical, com extensão do epitélio colunar na superfície externa do colo do útero, é comum em mulheres jovens, e essa superfície epitelial pode ser friável durante a relação sexual, tornando-a mais suscetível à infecção por *C. trachomatis* (QUINN et al., 1996; WIESENFELD, 2017).

2.2.6 Manifestações clínicas

As infecções causadas por *C. trachomatis* são frequentemente assintomáticas em homens e mulheres, o que resulta em casos não diagnosticados e conseqüentemente não tratados. A natureza assintomática favorece a transmissão entre parceiros e o estabelecimento de complicações e sequelas associadas à infecção, representando uma grave ameaça à saúde reprodutiva (LANE; DECKER, 2016).

Na mulher, a uretrite por *C. trachomatis* pode ser assintomática ou apresentar-se como síndrome uretral definida por sintomas como disúria, poliaciúria e piúria. Essa síndrome pode ser facilmente confundida com infecções exclusivas do trato urinário (LANE; DECKER, 2016). Assim, infecção por *C. trachomatis* deve ser investigada em pacientes sintomáticas, cujo exame parcial de urina apresente nitrito negativo e urocultura também negativa, principalmente em mulheres sexualmente ativas com idade inferior ou igual a 24 anos (LEE; SCHAFER, 2018).

A causa mais comum de cervicite na mulher é a infecção por *C. trachomatis*, que na sua maioria cursa de forma assintomática. Os sintomas quando presentes, são inespecíficos e podem incluir alterações no corrimento vaginal, sangramento vaginal intermenstrual, dor durante o intercuro sexual (dispareunia) e disúria. A cervicite mucopurulenta, definida pelo aparecimento de um corrimento endocervical turvo ou purulento, é observada no exame pélvico em 10% das mulheres assintomáticas. A ectopia edematosa, definida pelo aparecimento de vermelhidão em uma área do epitélio colunar da cérvix é incomum em cervicite por *C. trachomatis* (LEE; SCHAFER, 2018).

Estima-se que entre 15 e 40% das infecções primárias no trato genital feminino causadas por *C. trachomatis* possam ascender e disseminar-se para o trato genital superior, causando DIP. A DIP é definida como um conjunto de infecções do trato genital superior que pode compreender: endometrite (inflamação do endométrio), salpingite (inflamação das tubas uterinas), abscessos tubo-ovariano e/ou peritonite pélvica. É geralmente causada por infecções polimicrobianas do trato

genital superior feminino, em virtude de sua contaminação por microrganismos comensais da endocérvice e vagina. A maioria (70-80%) dos casos de DIP é subclínica ou silenciosa, entretanto, quando presentes, os sintomas mais comuns incluem dor pélvica ou abdominal baixa e náusea (WORKOWSKI, K. A.; BERMAN, 2010).

Ao exame clínico, podem ser observados sintomas como sensibilidade ao toque da cérvice e do útero. A progressão natural da DIP causada por *C. trachomatis*, promove consequências em longo prazo como infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica (LEE; SCHAFER, 2018). Parto prematuro, neonatos com baixo peso, aborto e parto natimorto são desfechos desfavoráveis causados pela infecção por *C. trachomatis* durante a gestação.

Aproximadamente dois terços dos homens com infecção por *C. trachomatis* apresentam sintomas, sendo a uretrite a manifestação mais comum da infecção (BACHMANN et al., 2015b). O exame físico pode revelar irritação ou eritema do meato uretral, e quando a secreção está presente tende a ser mucoide e não purulenta. As queixas de dor testicular ou escrotal com sensibilidade no exame são sugestivas do acometimento do epidídimo e testículos causando respectivamente a epididimite e orquite (BACHMANN et al., 2015; TAYLOR, 2015). No homem, a infecção por *C. trachomatis* pode disseminar-se da uretra para o epidídimo, causando epididimite em até 1% dos casos, infecções por *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae* são as causas mais comuns de epididimite aguda em homens sexualmente ativos com menos de 35 anos de idade (TAYLOR, 2015; TRACY; COSTABILE, 2009). Dor e sensibilidade testicular, eritema e inchaço escrotal, corrimento uretral ou acúmulo de fluido seroso no envoltório dos testículos (hidrocele) são sintomas presentes na infecção. Ao exame clínico, é observado edema palpável e sensibilidade no epidídimo (LEE; SCHAFER, 2018).

C. trachomatis também pode causar infecções retais ou orofaríngeas, dependendo das práticas sexuais (MEYERS; HALVORSON; LUCKHAUPT, 2007). A infecção retal pode ser assintomática ou manifestar-se como proctite; é mais comumente adquirida por intercurso anal receptivo, mas pode ocorrer por auto inoculação em mulheres com infecção geniturinária por *C. trachomatis* (WORKOWSKI, K., 2013). Os pacientes com infecção orofaríngea por *C. trachomatis* são geralmente assintomáticos, mas também podem apresentar sinais ou sintomas inespecíficos, como faringite ou linfadenopatia cervical (LANE; DECKER, 2016).

2.2.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da infecção por *C. trachomatis* ainda é um desafio, pois a maioria das infecções é assintomática e mesmo os casos sintomáticos podem não ser identificados devido à semelhança dos sintomas com outras ISTs. Portanto, o diagnóstico laboratorial é fundamental, especialmente em programas de rastreio (HOCKING et al., 2013).

A metodologia considerada padrão-ouro para o diagnóstico da *C. trachomatis* era a cultura celular (BEYDOUN et al., 2010; LEFEVRE, 2014; MARRAZZO; MARTIN, 2007), que teve um importante papel no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* na década de 1970. Contudo, as condições exigidas de transporte e armazenamento para manter a amostra clínica viável e a dificuldade de realização de cultivo celular delimitou sua disponibilidade apenas a grandes laboratórios e centros urbanos. A sorologia foi uma metodologia amplamente utilizada para tentar diferenciar infecções agudas e crônicas, entretanto, sua baixa sensibilidade e especificidade inviabilizou seu uso. A disponibilidade de diagnóstico para infecções por *C. trachomatis* tornou-se mais acessível nos anos 1980, quando foram introduzidos os testes de detecção antigênica: ensaio de imunofluorescência direta (EID) e o ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA, do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*). A medida que os testes de ELISA foram sendo aprimorados, outros ensaios de *point-of-care* (POC) foram desenvolvidos. Apesar dos testes POC, ELISA e EID apresentarem baixa sensibilidade e especificidade quando comparados à cultura, as desvantagens quanto ao transporte da amostra para cultura e a agilidade dos resultados fornecidos por esses testes, os tornaram uma escolha atrativa, principalmente em locais com alta prevalência (WHO, 2013b).

A utilização de sequências de ácidos nucleicos como alvos na detecção da infecção por *C. trachomatis* representou um grande avanço no diagnóstico da infecção, principalmente pela possibilidade de detecção concomitante de *N. gonorrhoeae*. Embora a sensibilidade dos ensaios de hibridização de ácidos nucleicos não amplificados (NAH, do inglês *non-amplified nucleic*) tenha sido equivalente à cultura, sua especificidade foi mais de uma vez interpelada.

O diagnóstico da infecção genital por clamídia evoluiu rapidamente a partir da década de 1990, sendo que os avanços mais importantes foram obtidos com a introdução dos NAATs. Os NAATs permitem a amplificação exponencial do DNA ou RNA alvo, em bilhões de cópias, a partir da utilização de variações da enzima Taq DNA

polimerase. Os alvos amplificados podem ser detectados por diferentes métodos, o que confere a cada teste um desempenho peculiar. Assim como os testes NAH, a utilização de NAATS permite a detecção simultânea de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em reação única. Os NAATs são mais sensíveis e específicos que os métodos tradicionais descritos anteriormente, e em geral permitem a utilização de diferentes tipos de amostras, incluindo amostras não invasivas como urina, além de *swabs* vaginais, *swabs* cervicais, *swabs* orais e *swab* anal, para o diagnóstico e rastreio da infecção por *C. trachomatis* (WHO, 2013).

Diversos estudos validaram a utilização de amostras obtidas por auto coleta (urina e *swabs* vaginal e anal), em comparação às amostras coletadas por um profissional de saúde, e verificaram taxas de detecção semelhantes utilizando NAATs (BACHMANN, L. H. et al., 2015b; CDC, 2014a; HAGGERTY et al., 2010; TAYLOR, 2015; TRACY; COSTABILE, 2009). Amostras obtidas por auto coleta podem facilitar o aumento do rastreio e diagnóstico e são atualmente recomendadas para *swabs* vaginais em mulheres (CDC, 2014b; WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, 2015). Os *swabs* retais por auto coleta também são recomendados como alternativa razoável aos *swabs* coletados por profissionais de saúde, mas atualmente não há dados suficientes para recomendar o uso de amostras de orofaringe obtidas por auto coleta. Embora os NAATs ainda não sejam aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para amostras de sítios extragenitais, os testes podem ser utilizados para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* em orofaringe e reto, desde que, os laboratórios que realizam esses testes estabeleçam critérios internos para garantir a qualidade dos resultados (CDC, 2014b; SCHACHTER et al., 2008; WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, 2015).

Os NAAT atualmente disponíveis, apresentam alta especificidade (> 99%) e sensibilidade (> 90%), teoricamente, são capazes de detectar uma única cópia da sequência alvo (JANSSEN et al., 2018). Eles não dependem da viabilidade da amostra (GOLDENBERG et al., 2008; HOCKING et al., 2013), possuem alto desempenho e são altamente recomendados para triagem e o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* (LANE; DECKER, 2016). Por outro lado, a cultura de *C. trachomatis*, que é considerada tecnicamente desafiadora, atualmente só é recomendada em casos de abuso sexual em crianças (CDC, 2014b; WORKOWSKI, K., 2013; WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, 2015).

A recomendação internacional é que o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* deva ser realizado em todos os pacientes sempre que exista suspeita clínica. Além disso, todas as mulheres sexualmente

ativas, com menos de 24 anos, devem ser examinadas anualmente, assim como, as mulheres com 25 anos ou mais, que apresentam risco aumentado de infecção (novo parceiro sexual, mais de um parceiro sexual, parceiro sexual com IST, pratica sexual com mais de um parceiro simultaneamente) (LEFEVRE, 2014; WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, 2015). Embora a triagem rotineira da infecção por *C. trachomatis* em homens não seja atualmente recomendada, pode ser apropriada em populações de alto risco (usuários de clínicas de ISTs, profissionais do sexo e população carcerária) (LEFEVRE, 2014; WORKOWSKI; BOLAN, 2015). Além disso, é recomendado o rastreamento anual para *C. trachomatis* com NAAT em homens que fazem sexo com homens (HSH) (WORKOWSKI; BOLAN, 2015).

Países como Inglaterra, Estados Unidos e Canadá realizam rastreamento com testes moleculares de todas as mulheres jovens sexualmente ativas, devido à alta prevalência da doença nesta faixa etária, aos riscos associados à infecção por *C. trachomatis*, além do curso assintomático da infecção (AHRQ, 2007; CDC, 2015; NCSSG, 2006). Apesar da consistência das indicações, o Brasil ainda não possui um programa de rastreamento de infecções por *C. trachomatis*.

Os NAATs possuem desempenho superior às demais metodologias disponíveis para detecção de *C. trachomatis* (BLACK et al., 2002; VAN-DER-POL et al., 2001) e, são os ensaios recomendados pelo CDC para o rastreamento e diagnóstico da infecção genital e extragenital por *C. trachomatis*. Embora os NAATs apresentem dificuldades quanto à necessidade de estruturas laboratoriais complexas, profissionais treinados, susceptibilidade de contaminação do ambiente em virtude da amplificação exponencial do material genético alvo e resultados falsos negativos por inibidores presentes na amostra, as vantagens desses testes são soberanas em relação às desvantagens. Seu uso deve ser incentivado, mesmo em lugares com recursos limitados, por meio da criação de laboratórios de referência que possam disponibilizar esses testes (WHO, 2013).

2.3 NAATS PARA O DIAGNÓSTICO DE *C. TRACHOMATIS* E *N. GONORRHOEAE*

Atualmente, cinco fabricantes possuem testes comercialmente disponíveis e aprovados pelo FDA para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em infecções do trato genital feminino e masculino, utilizando *swabs* vaginais para mulheres e urina de primeiro jato para homens. Além do ensaio Xpert CT/ NG Assay (Cepheid) que será

apresentado na sessão de metodologia, destaca-se os testes da Abbott Realtime m2000 CT/ NG (Abbott), Cobas Amplicor CT/ NG (Roche) Aptima, (Hologic / Gen-Probe); BD ProbeTec ET e Qx (Becton Dickinson) (CDC,2014).

A Abbott disponibiliza dois testes, o combo RealTime *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* e detecção somente de *C. trachomatis* pela metodologia de PCR em tempo real em um sistema automatizado, o m2000 (Abbott Molecular, EUA). O m2000 é um equipamento automatizado que executa desde a extração do DNA por *beads* magnéticas até o preparo da placa da reação de PCR. A reação de PCR ocorre no termociclador em tempo real m2000rt, que detecta a amplificação do material genético alvo pela fluorescência emitida quando as sondas se ligam especificamente a sequências-alvo amplificadas durante cada ciclo de amplificação. O ensaio emprega como alvo duas sequências distintas do plasmídeo críptico de *C. trachomatis* (presente de 7 a 10 cópias/ bactéria) a fim de garantir a detecção da variante sueca de *C. trachomatis* (nvCT) (UNEMO; CLARKE, 2011). O sistema é capaz de detectar múltiplos sinais, o que permite a detecção simultânea de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e um controle interno de DNA de planta adicionado durante o processo de extração para garantir a eficiência da extração e do processo de amplificação. Esse sistema é apto para o processamento de 96 amostras por corrida, sendo capaz de processar 186 amostras e seis controles num período de aproximadamente oito horas (WHO, 2013).

O ensaio Cobas Amplicor CT/NG (Roche Diagnostics, EUA), é baseado na tecnologia de amplificação do DNA alvo com *primers* biotinizados, seguido de hibridização. Os amplicons são hibridizados em esferas magnéticas cobertas por sondas com sequências específicas para o plasmídeo críptico da *C. trachomatis*. O processo de detecção é baseado em interações entre biotina e avidina. Num período de oito horas é possível testar 96 amostras.

Um ensaio de segunda geração comercializado pela Roche é o Cobas TaqMan CT v2.0. que é um teste baseado na tecnologia de PCR em tempo real que permite um sistema de processamento automático. O teste está disponível para detecção somente de *C. trachomatis* ou em associação com a detecção de *N. gonorrhoeae*. O ensaio de última geração, denominado de Cobas 4800 CT/NG, é um teste de PCR em tempo real totalmente automatizado. Tanto o Cobas TaqMan CT v2.0 e o Cobas 4800 CT/NG detectam dois alvos de *C. trachomatis*, o plasmídeo críptico a fim de garantir a amplificação da nvCT (UNEMO et al., 2010; UNEMO; CLARKE, 2011) e o gene *ompA* que codifica a

principal proteína da membrana externa (MOMP) da *C. trachomatis*. o ensaio possui um controle de amplificação e podem ser testadas até 278 amostras em oito horas (WHO,2013).

O ensaio APTIMA Combo 2 (Gen-Probe, EUA) é baseado na tecnologia de captura de uma sequência do 23S rRNA de *C. trachomatis* e do 16S rRNA de *N. gonorrhoeae* por oligonucleotídeos de captura e esferas magnéticas com DNA, seguido pela amplificação mediada por transcrição (TMA, do inglês *transcription-mediated amplification*), de uma sequência do 23S rRNA de *C. trachomatis*. A amplificação é revelada por meio da cinética da emissão de luz por sondas de DNA marcadas e complementares à região alvo (CHONG et al., 2003). Utilizando um sistema automatizado (TIGRIS), é possível analisar cerca de 500 amostras em oito horas (WHO,2013).

O teste da BD para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, o ProbeTec ET (Becton, Dickinson and Company, EUA), utiliza a tecnologia de amplificação por deslocamento de cadeia (SDA, do inglês *strand displacement amplification*) isotérmico para amplificar e detectar as sequências-alvo a temperatura de 52,5°C. O sistema é baseado na amplificação de uma sequência do plasmídeo críptico da *C. trachomatis* e toda a reação de amplificação ocorre em uma placa selada com um leitor de transferência de energia fluorescente (WHO, 2013). O ensaio de DNA amplificado BD ProbeTec GC Qx é baseado na amplificação de um gene de inversão de pilina para detecção de *N. gonorrhoeae*. No entanto, a especificidade subótima (particularmente analítica) e a reação cruzada com espécies de *Neisserias* comensais foram descritas para este ensaio (PALMER et al., 2003; POPE et al., 2010; TABRIZI et al., 2011). Recentemente, o ensaio de PCR em tempo real BD Max GC, visando o gene gonococcal *opcA*, foi desenvolvido para ser executado no sistema BD Max, que fornece extração automatizada de DNA e PCR em tempo real (GOLPARIAN et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar uma PCR-Multiplex *in house* para a detecção simultânea de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, validar com uma metodologia aprovada pelo FDA Xpert CT/NG (Cepheid), e comparar com outra metodologia comercialmente disponíveis o Kit Multiplex Uretrite Plus (XGEN), além de determinar a prevalência da infecção por *N. gonorrhoeae* e por *C. trachomatis* em gestantes de alto risco em trabalho de parto prematuro, atendidas na emergência obstétrica do Hospital Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar a PCR convencional tipo *multiplex in house* para detecção de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*;
- Validar os resultados obtidos pela PCR-multiplex *in house* para detecção de *N.gonorrhoeae* e *C. trachomatis* com o kit comercial Xpert CT/NG Cepheid;
- Validar os resultados obtidos para detecção de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* do kit comercial Multiplex Uretrite Plus (Kit XGEN Multi UP) utilizando o Xpert CT/NG Cepheid como padrão ouro;
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR-multiplex *in house* e kit comercial Multiplex Uretrite Plus (Kit XGEN Multi UP), adotando como padrão ouro o kit comercial Xpert CT/NG Cepheid;
- Determinar a prevalência de infecção por *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* e da coinfeção nas gestantes de alto risco atendidas na emergência obstétrica utilizando o kit comercial Xpert CT/NG Cepheid.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina sob o nº CAAE 83398218.5.0000.0121.

4.2 DESCRIÇÃO DO ESTUDO

Estudo transversal analítico com análise retrospectiva de dados.

4.3 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO

A pesquisa foi realizada no Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) na cidade de Florianópolis, Santa Catarina, no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia LBMMS/CCS/UFSC.

4.4 AMOSTRAGEM

O estudo incluiu 100 amostras, uma de secreção ocular (de recém-nascido) e 99 amostras de raspado endocervical, coletadas em meio de UTM™ RT (Copan, EUA) e armazenadas em freezer -80°C, que constituem o banco de amostras de gestantes atendidas na emergência obstétrica do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC), no período de 2017-2018.

Desde 2014 a emergência obstétrica segue um protocolo de investigação de possíveis causas infecciosas para ruptura prematura de membranas, coletando de todas as gestantes nessa condição, uma rotina de exames composta por bacterioscopia, pesquisa de *N. gonorrhoeae* (cultura, coleta realizada em meio de transporte de Amies com carvão), pesquisa de *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma urealyticum/parvum* (cultura, coleta realizada em meio de transporte específico) e pesquisa de *C. trachomatis* (até 2016 realizada por imunofluorescência direta; a partir de 2017 realizada por PCR, coletada em meio de UTM™ RT). PCR *in house* para *C. trachomatis* foi previamente validada por Vieira (2016).

O desenho de uma PCR- multiplex para detecção concomitante de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, objeto deste estudo, foi proposto pelo setor de microbiologia do HU para aumentar a sensibilidade da

metodologia (cultura) utilizada atualmente para pesquisa de *N. gonorrhoeae*.

4.5 MEIO DE TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

A coleta das amostras para detecção de *C. trachomatis*, posteriormente utilizadas para pesquisa de *N. gonorrhoeae*, foi realizada com o kit UTM™ – RT (*Universal Transport Medium*, Copan - EUA), que contém um swab flocado com haste adaptada para partição e um tubo contendo três mililitros de líquido conservante, constituindo um meio de transporte estável a temperatura ambiente (*room temperature* - RT). O líquido conservante é composto por proteínas estabilizadoras, antimicrobianos e um tampão para manter o pH neutro, e mantém a viabilidade e infectividade de vírus, *Chlamydia*, *Mycoplasma* e *Ureaplasma*. A coleta do raspado endocervical foi realizada com o swab flocado, posteriormente inoculado no tubo com líquido conservante, para transporte e armazenamento.

4.6 TESTES LABORATORIAIS

4.6.1 PCR multiplex para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*

4.6.1.1 Extração de DNA

Para a extração do DNA das amostras em UTM foi utilizado o QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen - Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Para a extração do DNA de cultura da cepa padrão WHO L foi preparada uma suspensão bacteriana com PBS estéril a partir de cultura pura em ágar chocolate (Laborclin, Brasil). A suspensão foi fervida por 10 minutos. O lisado bacteriano foi centrifugado a 2000 x g por 5 minutos, e o sobrenadante (contendo o DNA) foi armazenado a -20°C (MARTIN, I. M. C. et al., 2004). O DNA plasmidial de *C. trachomatis* foi extraído pelo PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, USA) seguindo as instruções do fabricante.

4.6.1.2 PCR multiplex

Os iniciadores CTP1 (5'-TAGTAACTGCCACTTCATCA-3') e CTP2 (5'-TTCCCCTTGTAATTCGTTGC -3') foram utilizados para

amplificação de um segmento de 201 pares de base (pb) da ORF de número 4 do plasmídeo críptico de *C. trachomatis* (GRIFFAIS; THIBON, 1989). Para detecção de *N. gonorrhoeae* foram utilizados dois alvos, gene *porA* que codifica a maior proteína de membrana da bactéria e o gene 16S. Os iniciadores *porA*-F (5'-CGGCAGCATTCAATTTGTT-3') e *porA*-R (5'-TCAATGGATCGGTATCACTCG-3') foram utilizados para amplificação de um segmento 260 pb (O'CALLAGHAN; CORCORAN; LUCEY, 2010) e os iniciadores WL5744 (5'-CGGAACGTACCGGGTAGC-3'), WL5839 (5'-GCTACCCACGCTTTTCGGA-3') foram utilizados para amplificação de um segmento de 648 pb do gene 16S (CAO et al., 2015). Como controle interno da reação, foram utilizados os iniciadores PC03 (5'-ACACAA CTGTGTTCACTAGC-3') e PC04 (5'-CAACTCATCCACGTTCCACC-3') que flanqueiam um segmento de 110 pb do gene da beta- globina humana (SAIKI et al., 1988).

Para a padronização da PCR multiplex foram utilizados dois kits de Taq Polimerase: QIAGEN® Multiplex Master Mix (Quiagen, USA) e GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega, EUA). Para o kit QIAGEN® Multiplex Master Mix (Quiagen, USA) foram testados três protocolos (**Quadro 1**) com as seguintes condições: 95°C/15 min (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos: 95°C/30 s (desnaturação), 57°C/90 s (pareamento), 72°C/60 s (extensão) e um ciclo final de 60°C/30 min (extensão final). Para o kit GoTaq® Hot Start Polymerase foram testados dois protocolos (**Quadro 2**) com as com as seguintes condições: 95°C/15min (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos: 95°C/30 s (desnaturação), 57°C/90 s (pareamento), 72°C/60 s (extensão) e um ciclo final de 72°C/10 min (extensão final). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,0% (100V/ 55 minutos), corados pelo brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta no ImagenQuant LAS500 (GE- EUA). O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação ao padrão de tamanho molecular (DNA ladder 100 pb Ludwig).

Controles positivos: para a padronização da PCR multiplex foi utilizado DNA de cultura de uma cepa padrão de *N. gonorrhoeae* da OMS (WHO L) (UNEMO et al., 2016) e um controle positivo clonado do plasmídeo críptico de *C. trachomatis*.

Quadro 1. Protocolos utilizados com o Kit QIAGEN® Multiplex Master Mix

Protocolo 1		Protocolo 2		Protocolo 3	
Reagentes	Conc. final	Reagentes	Conc. final	Reagentes	Conc. final
Água	-	Água	-	Água	-
Master Mix	1 X	Master Mix	1X	Master Mix	1X
Q-solution 5X	0,2 X	DMSO	1,0%	Pool primers ^a	0,2µM
Pool primers ^a	0,2 µM	Pool primers ^a	0,2µM	DNA	2,0 µl ^b
DNA	2,0 µl ^b	DNA	2 µl ^b		
Vol. final	50 uL	Vol. final	50 uL	Vol. final	50 uL

^aConcentração de 2µM de cada primer. ^bO DNA não foi quantificado para a reação.

Quadro 2. Protocolos utilizados com o kit GoTaq® Hot Start Polymerase

Protocolo 4		Protocolo 5	
Reagentes	Conc. final	Reagentes	Conc. final
Água	-	Água	-
Tampão 5X	1X	Tampão 5X	1X
MgCl ₂	2,0 mM	MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM	dNTP	0,2 mM
Glicerol	5,0 %	Glicerol	5,0 %
CTP1/CTP2	0,3 µM	CTP1/CTP2	0,3 µM
PCO3/PCO4	0,3 µM	PCO3/PCO4	0,3 µM
PorAF/PorAR	0,3 µM	PorAF/PorAR	0,3 µM
WL5744/WL5839	0,08 µM	WL5744/WL5839	0,08 µM
Taq Gold	1,25 U	Taq Gold	1,25 U
DNA ^b	2,0 uL	DNA*	2,0 uL
Vol. final	25,0 uL	Vol. final	25,0 uL

^bO DNA não foi quantificado para a reação.

4.6.1.3 Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica da PCR multiplex foi determinada com DNA extraído da cepa padrão da OMS (WHO L) de *N. gonorrhoeae* e um plasmídeo contendo um segmento de 201 pb clonado do plasmídeo críptico da *C. trachomatis*.

A concentração inicial dosada no equipamento NanoVue Plus (GE), foi de 2443 ng/µL para *C. trachomatis* e 103,5 ng/µL para *N.*

gonorrhoeae. Os DNAs de ambos os controles foram ajustados para 100 ng/ μ L e a partir dessa concentração foram realizadas diluições seriadas separadas para cada microrganismo. O DNA de cultura da cepa WHO L de *N. gonorrhoeae* e o DNA plasmidial de *C. trachomatis* foram diluídos separadamente (razão 2) partindo da concentração de 100 ng/ μ L, até a concentração de 0,19 pg/ μ L (correspondente a 20 diluições). Como o DNA plasmidial de clamídia continuava amplificando, ele foi diluído novamente (razão 2) partindo da concentração de 3,12 ng/ μ L até a concentração de 6×10^{-3} pg/ μ L. O mix de DNA de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi realizado a partir da concentração inicial de 3,12 ng/ μ L de cada um deles e foi diluído da mesma forma descrita para o DNA isolado de *C. trachomatis*.

4.6.2 Xpert CT/NG Cepheid

O ensaio Xpert CT/NG Cepheid é um teste comercial *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real (qPCR) com sondas TaqMan (qPCR/TaqMan). O kit tem capacidade para detecção simultânea qualitativa do DNA de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. Permite a detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em amostras de urina, swab endocervical e vaginal (por auto coleta).

4.6.2.1 Princípio do teste

O ensaio Xpert CT/NG é um teste de diagnóstico *in vitro* totalmente automatizado para a detecção simultânea de DNA de *C. trachomatis* e de *N. gonorrhoeae*. Todo o ensaio é realizado dentro de um cartucho único, no equipamento GeneXpert® (Cepheid, EUA). Esse sistema integra a extração e purificação do DNA, reação de amplificação dos ácidos nucleicos e a detecção das sequências-alvo em amostras clínicas utilizando a tecnologia qPCR (CEPHEID, 2012).

O sistema de diagnóstico GeneXpert® é composto por cartuchos descartáveis, GeneXpert® (equipamento para inserção do cartucho), um software e um identificador de código de barras para a realização dos testes (**Figura 9**). Os cartuchos descartáveis possuem todos os reagentes necessários para realização da qPCR e são independentes, minimizando as chances de contaminação cruzada entre cartuchos durante a realização dos testes (CEPHEID, 2012).

Figura 9. Sistema de diagnóstico GeneXpert®

A: Equipamento GeneXpert® e computador com software; **B:** leitor de código de barras dos cartuchos; **C:** cartucho (onde é inserido a amostra e ocorre toda a reação de qPCR) e **D:** Equipamento GeneXpert®^c carregado com cartuchos.
Fonte: Autor.

O ensaio iniciou-se com a dispensação de 300 µL da amostra primária (raspado endocervical em meio UTMTM – RT) na câmara do cartucho Xpert CT/NG. O cartucho GeneXpert (Cepheid) foi posteriormente carregado na plataforma do sistema no instrumento GeneXpert, que realizou todo o processamento da amostra (desde a extração do DNA até a qPCR) automaticamente. O resultado foi fornecido em aproximadamente 90 minutos. A reação foi realizada no setor de microbiologia da Divisão de Análises Clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago.

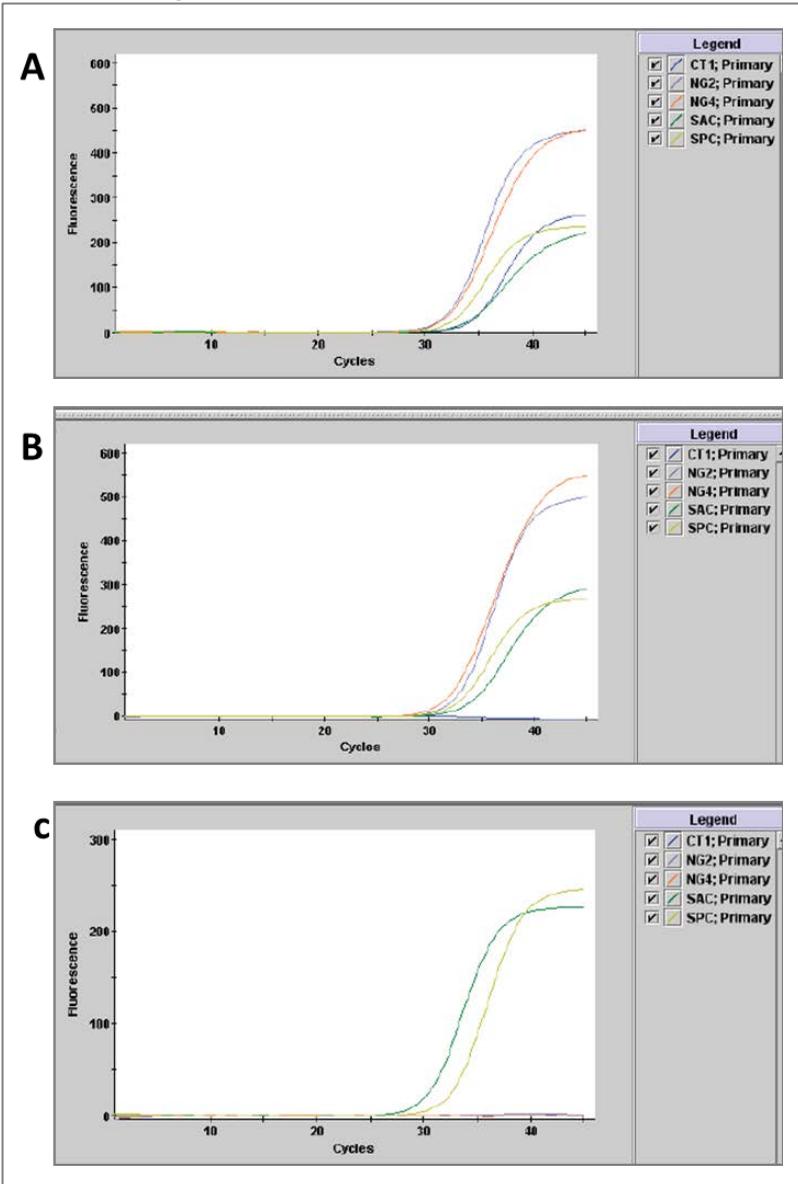
4.6.2.2 Controle de qualidade

O cartucho Xpert CT/NG possui três controles para garantir a qualidade dos resultados gerados: controle do processamento da amostra (SPC, do inglês, Sample Processing Control, controle da adequação da amostra (SAC, do inglês, Sample Adequacy Control) e um controle da integridade da sonda (PCC – Probe Check Control). O SPC tem como função assegurar o processamento correto da amostra; contém DNA genômico de *Bacillus globigii* que é incluído em cada cartucho para garantir que a extração do DNA ocorreu adequadamente. Além disso, esse controle também é utilizado para verificar a presença de inibição associada à amostra na qPCR (ele deve ser detectado em amostras negativas para *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae*, mas pode ser ou não detectado em amostras reagentes para uma ou ambas as infecções). O SAC tem como função assegurar que a amostra contenha células humanas e que o processo de lise celular e extração do DNA sejam eficientes; a reação de multiplex inclui um conjunto de primers específicos para um gene humano de cópia única. A amplificação do SAC deve ser considerada apenas em amostras que não sejam reagentes para *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae*; a ausência de amplificação do SAC indica ausência de células humanas na amostra (por quantidade insuficiente da amostra ou por falha no processo de lise celular). O PCC controla a integridade das sondas utilizadas. Antes de iniciar a reação de qPCR, o sistema GeneXpert (Cepheid) mensura o sinal de fluorescência das sondas para monitorar a reidratação das esferas de reagentes, preenchimento do tubo de reação, integridade da sonda e estabilidade dos fluoróforos. Para detecção de *C. trachomatis* o teste possui um conjunto de primers e uma sonda dirigidos especificamente ao cromossomo da *C. trachomatis*; para a detecção de *N. gonorrhoeae* o sistema possui um conjunto de iniciadores e duas sondas (NG2 e NG4) complementares a duas regiões distintas de *N. gonorrhoeae*, sendo que um teste para *N. gonorrhoeae* só é considerado reagente se ambas as sondas emitirem fluorescência (CEPHEID, 2012).

4.6.2.3 Interpretação dos resultados

Os resultados são interpolados pelo sistema do GeneXpert (Cepheid) por meio da medição dos sinais fluorescência a medida que a amplificação do DNA alvo ocorre. O ensaio (**Figura 10**) Xpert CT/NG fornece resultados para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* de acordo com o algoritmo descrito no **Quadro 3**.

Figura 10. Resultados fornecidos pelo software GeneXpert (Cepheid) para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.



A: amostra reagente para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. **B:** amostra reagente para *C. trachomatis* e não reagente para *N. gonorrhoeae*. **C:** amostra não reagente para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. Fonte: (CEPHEID, 2012).

Quadro 3. Possíveis resultados para o ensaio CT/NG

Resultado	CT1	NG2	NG4	SPC	SAC
CT detectado NG detectado	+	+	+	+/-	+/-
CT detectado NG não detectado	+	+	-	+/-	+/-
CT detectado NG não detectado	+	-	+	+/-	+/-
CT não detectado NG detectado	-	+	+	+/-	+/-
CT não detectado NG não detectado	-	-	+	+/-	+/-
CT não detectado NG não detectado	-	+	-	+/-	+/-
CT não detectado NG não detectado	-	-	-	+	+
Inválido	-	-	-	-	+/-
Inválido	-	-	-	+/-	-

+: reagente, - não reagente, +/-: reagente ou não reagente, CT: *C. trachomatis* e NG: *N. gonorrhoeae*.

4.6.3 Kit Multiplex Uretrite Plus (Kit XGEN Multi UP)

O Kit Multiplex Uretrite Plus (Kit XGEN Multi UP) é um teste comercial *in vitro* baseado na tecnologia de PCR em tempo real com sondas TaqMan (qPCR/TaqMan). O kit tem capacidade para detecção qualitativa do DNA de até sete patógenos sexualmente transmissíveis: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* em amostras de urina, *swab* genital e retal. Contudo, somente *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foram objetos deste estudo. O Kit é fabricado pela empresa Mobius Life Science Comércio de Produto para Laboratórios Ltda, sob registro 80502070044 na Anvisa.

4.6.3.1 Princípio do teste

O Kit XGEN Multi UP é um teste de diagnóstico *in vitro* para detecção de DNA de até sete patógenos utilizando a tecnologia de q-PCR com sonda TaqMan. A extração do DNA foi realizada com o Kit de extração BIOPUR Kit de Extração Mini Spin Plus, citomegalovírus de murino (mCMV) foi utilizado como controle de extração (controle interno). Para garantir a eficiência do processo de extração foram adicionados 2 µL de mCMV (controle interno) a cada amostra clínica que já continha o tampão de lise celular. A extração do DNA foi realizada de acordo com instruções do fabricante. O Kit tem capacidade para realização de 64 reações e é composto por oito reagentes descritos no **Quadro 4**. O gene ORF8 foi utilizado como alvo para a detecção do DNA de *C. trachomatis* e o gene que codifica a proteína da opacidade (opa) foi utilizado como alvo para detecção de *N. gonorrhoeae*.

Quadro 4. Reagentes que compõem o Kit XGEN Multi UP

Reagente	Composição
EZ UP	Solução de enzima e dNTPs,
TAMPÃO UP	Mistura de tampão
PS UP1	Mistura de <i>primers</i> e sondas para CT, GC, MG, mCMV (CI)
PS UP2	Mistura de Primers e Sondas para Tvag, Mhom, Uurea, Uparv
CP UP 1	Controle Positivo Contendo plasmídeos para Detecção de CT, NG, MG
CP UP 2	Controle Positivo Contendo plasmídeos para detecção de Tvag, Mhom, Uurea, Uparv
CI UP	Controle interno
CN*	Controle negativo

CT: *C. trachomatis*, CG: *N. gonorrhoeae*, MG: *M. genitalium*, Mcmv (CI): citomegalovírus de murinho (controle interno), Tvag: *T. vaginalis*, Mhom: *M. hominis*, Uurea: *U. urealyticum*, Uparv: *U. parvum*. *Solução pronta para uso que deve ser utilizada desde o processo de extração. Fonte: (MOBIUS,2016).

Quadro 5. Protocolo da qPCR com Kit XGEN Multi UP

<i>Master Mix</i>	1X
Tampão UP	12,5 µL
PS UP 1*	1,5 µL
EZ UP	1,0 µL
Volume total	15 µL
DNA	10 µL

*Iniciador para detecção de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, e *T. vaginalis*.
Fonte:(MOBIUS, 2016).

O protocolo da qPCR está descrito no **Quadro 5** e a reação ocorreu no equipamento de PCR em Tempo Real ABI™ SDS 7500 (Thermo Fisher Scientific, EUA). A cada *well* foram adicionados 15 µL do *master mix* e 10 µL do DNA. A seleção dos fluorófolos foi de acordo com o **Quadro 6**. No **Quadro 7** está descrito um exemplo de mapa da placa de qPCR. O programa da qPCR foi composto por um ciclo de 42°C/15 min. (*hold*), um ciclo de 94°C/3 min. (*hold*) e 40 ciclos de 94°C/8seg. e 64°C/34seg.

Segundo a bula do kit, o teste tem sensibilidade para detectar a partir de 1.000 cópias/mL de DNA de *N. gonorrhoeae* e de *C. trachomatis*.

Quadro 6. Fluorófolos para a reação da q-PCR com Kit XGEN Multi UP

Detector	Corante	Quencher
<i>N. gonorrhoeae</i> e <i>T.vaginalis</i>	FAM	Sem emissão fluorescência
<i>M. genitalium</i> e <i>U.</i> <i>urealyticum</i>	V/C	Sem emissão fluorescência
<i>C. trachomatis</i> e <i>U.</i> <i>parvum</i>	ROX	Sem emissão fluorescência
<i>M. hominis</i> e mCMV (CI)	CY5	Sem emissão fluorescência

Fonte: (MOBIUS,2016)

Quadro 7. Exemplo de mapa de placa da qPCR com Kit XGEN Multi UP

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
B	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
C	CP1	CP2	CN								
D											
E											
F											
G											
H											

A: reação com os iniciadores PSUP1, B: reação com iniciadores PSUP2; C: controle positivo e CN: controle negativo Fonte: (MOBIUS,2016)

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

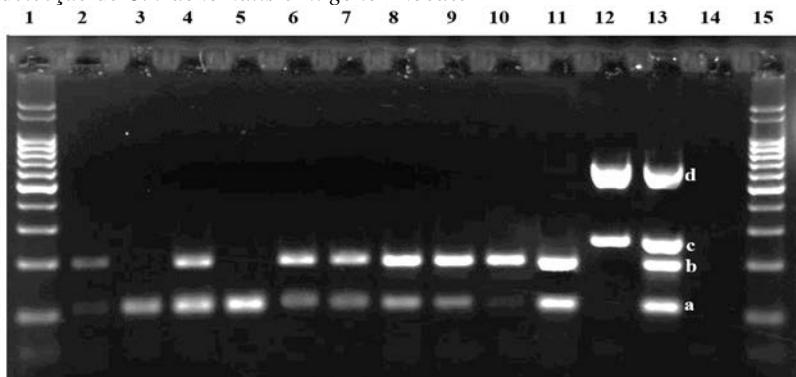
Foi utilizado o teste Kappa para determinar a concordância da detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* entre os ensaios, PCR multiplex *in house* e Kit XGEN Multi UP (XGEN) com GeneXpert (Cepheid). Foi adotado como referência os valores de Kappa determinados por Altman (1991): concordância pobre foi atribuída para valores de Kappa entre 0,00-0,20, concordância razoável para valores entre 0,21 a 0,40, concordância moderada para valores entre 0,41-0,60, boa concordância para valores 0,61- 0,80 e concordância excelente para valores entre 0,81-1,00. O Diagrama de Venn foi realizado para determinar a concordância entre as amostras positivas para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* na PCR-multiplex *in house*, no XGEN Multi UP (XGEN) e no ensaio Xpert CT/NG (Cepheid). O Diagrama de Venn, a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) da PCR multiplex *in house* foram determinados pelo Software Microsoft Office Excel versão 2016. A associação entre a idade e os desfechos positividade para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* e da coinfeção *C. trachomatis/N. gonorrhoeae* foi realizada pelo teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. Para verificar a correlação entre a variável nominal (idade) e o desfecho positividade para *C. trachomatis* foi utilizada a Análise de Regressão Logística Binária. Utilizou-se o programa SPSS Statistical Package for Social Sciences (SPSS software, versão 17.0, EUA) para a realização dos testes Qui-quadrado, Exato de Fisher, Regressão Logística Binária e Kappa.

5 RESULTADOS

5.1 PADRONIZAÇÃO PCR MULTIPLEX C. TRACHOMATIS E N. GONORRHOEAE

O protocolo quatro (**Quadro 2**) foi o que forneceu os melhores resultados para a reação de PCR-multiplex nas seguintes condições: 95°C/15min (desnaturação inicial), seguido de 40 ciclos: 95°C/30s (desnaturação), 57°C/90s (pareamento), 72°C/60s (extensão) e um ciclo final de 72°C/10min. (extensão final) (**Figura 11**).

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose representativa da PCR multiplex para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.



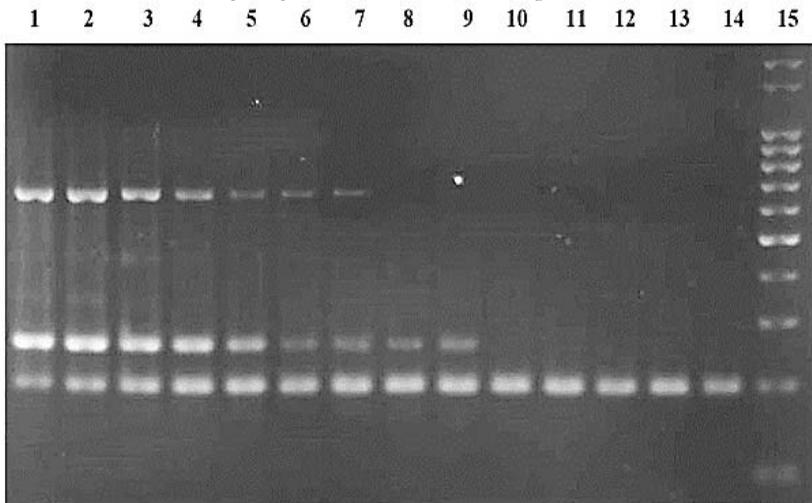
Posições 2 a 11: amostras clínicas; canaleta 12: DNA da cepa padrão WHO L de *N. gonorrhoeae*; posição 13: Controle Positivo para *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* e β -globina; posição 14: Controle negativo; posições 1 e 15: marcador de tamanho molecular de 100pb. Amostras 2, 4, 6-11 foram positivas para *C. trachomatis* e controle interno da β -globina e as amostras 3 e 5 foram positivas somente para o gene da β -globina. A: 110 pb do gene da β -globina, b: 201 pb do plasmídeo críptico da *C. trachomatis*, c: 260 pb da porina de *N. gonorrhoeae* e d: 648 pb do gene 16S de *N. gonorrhoeae*.

A sensibilidade analítica da PCR-multiplex utilizando o mix de DNA (clamídia e gonococo) foi de 12,19 pg para os iniciadores PorAF/R (alvo porina de *N. gonorrhoeae*) e 48 pg para os iniciadores WL5744/WL5839 (alvo 16S de *N. gonorrhoeae*) (**Figura 12A/B**). A sensibilidade analítica da PCR Multiplex para detecção de *N. gonorrhoeae* foi de 48 pg ($1,93 \times 10^4$ cópias/uL) uma vez, que a OMS

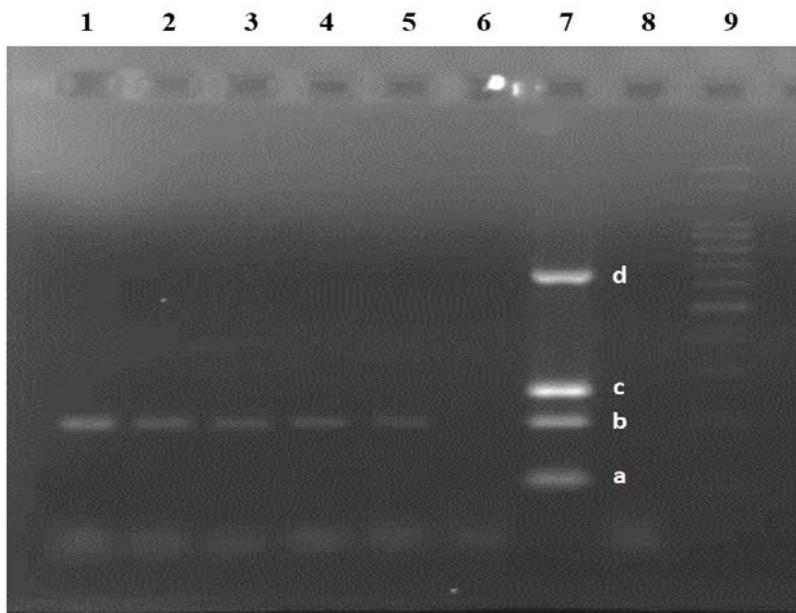
recomenda o uso de dois alvos diferentes para o diagnóstico definitivo de infecções gonocócicas por NAAT(WHO, 2013). Para a detecção de clamídia a sensibilidade da PCR-multiplex foi 0,012 pg. ($1,56 \times 10^3$ cópias/uL).

Também foi determinada a sensibilidade da PCR-multiplex quando somente um dos DNAs alvos dos microrganismos pesquisados estava presente o objetivo foi avaliar a sensibilidade da reação multiplex para cada alvo na ausência de coinfeção. Nesse contexto a sensibilidade da PCR multiplex para a detecção de *N. gonorrhoeae* foi de 1,5 pg de DNA ($6,04 \times 10^2$ cópias/uL), 0,38 pg para os iniciadores PorAF/R e 1,5 pg para os iniciadores WL5744/WL5839 (**Figura 13**) e para detecção de *C. trachomatis* foi $\leq 6,0 \times 10^{-3}$ pg de DNA (**Figura 14**).

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose representativa da sensibilidade analítica da PCR-multiplex para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.

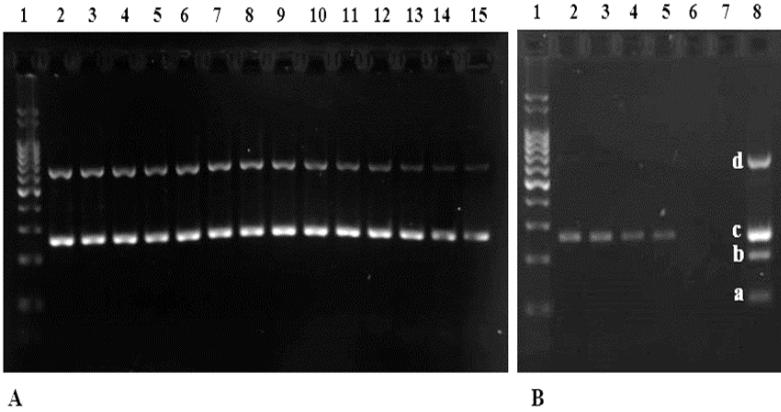


12A: Posições 1 a 14: mix de DNA de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. Posições 1: 3,12 ng, posição 2: 1,56 ng, posição 3: 0,78 ng, posição 4: 0,39 ng, posição 5: 0,195 ng, posição 6: 97,5 pg, posição 7: 48,75 pg, posição 8: 24,38 pg, posição 9: 12,19 pg, posição 10: 6,01 pg, posição 11: 3,0 pg, posição 12: 1,50 pg, posição 13: 0,75 pg, posição 14: 0,38 pg e posição 15: marcador de tamanho molecular de 100 pb.



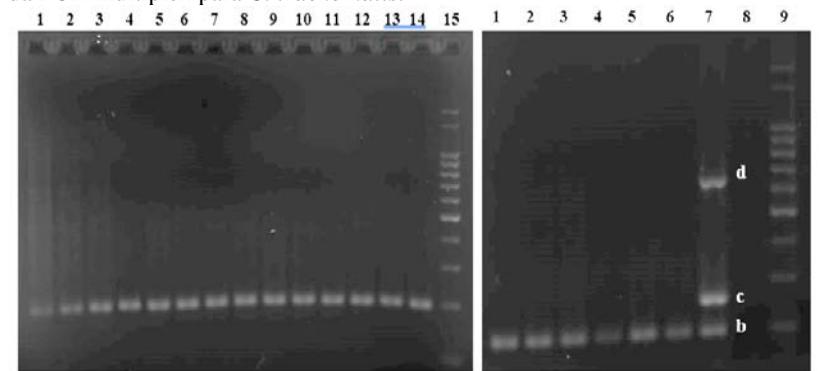
12B: Posições 1 a 6: mix de DNA de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. Posição 1: 0,19 pg, posição 2: 0,095 pg, posição 3: 0,048 ng, posição 4: 0,024 ng, posição 5: 0,012 pg, posição 6: 0,006 pg, posição 7: Controle Positivo para *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* e β -globina. A: 110 pb do gene da β -globina, b: 201 pb do plasmídeo críptico da *C. trachomatis*, c: 260 pb da porina de *N. gonorrhoeae* e d: 648 pb do gene 16S de *N. gonorrhoeae*, posição 8: controle negativo e posição 9: marcador de tamanho molecular de 100 pb.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose representativa sensibilidade analítica da PCR-multiplex para *N. gonorrhoeae*.



A: Canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100pb. Canaleta 2 a 14: DNA de *N. gonorrhoeae*. Canaleta 2: 100 ng, canaleta 3: 50 ng, canaleta 4: 25 ng, canaleta 5: 12,5 ng, canaleta 6: 6,25 ng, canaleta 7: 3,12 ng, canaleta 8: 1,56 ng, canaleta 9: 0,39 ng, canaleta 10: 0,19 ng, canaleta 11: 97 pg, canaleta 12: 48 pg, canaleta 13: 24 pg, canaleta 14: 12 pg e canaleta 15: 6 pg. **B:** Canaleta 1: marcador de tamanho molecular de 100pb. Canaleta 2 a 6: DNA de *N. gonorrhoeae*. Canaleta 2: 3 pg, canaleta 3: 1,5 pg, canaleta 4: 0,75 pg, canaleta 5: 0,38 pg, canaleta 6: 0,19 pg, canaleta 7: controle negativo, canaleta 8: Controle Positivo para *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* e β -globina. A: 110 pb do gene da β -globina, b: 201 pb do plasmídeo críptico da *C. trachomatis*, c: 260 pb da porina de *N. gonorrhoeae* e d: 648 pb do gene 16S de *N. gonorrhoeae*.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose representativa sensibilidade analítica da PCR-multiplex para *C. trachomatis*.



A: Canaleta 1 a 14: DNA de *C. trachomatis*. Canaleta 1: 3,12 ng, canaleta 2: 1,56 ng, canaleta 3: 0,78 ng, canaleta 4: 0,39 ng, canaleta 5: 0,195 ng, canaleta 6: 97,5 pg, canaleta 7: 48,75 pg, canaleta 8: 24,38 pg, canaleta 9: 12,19 pg, canaleta 10: 6,01 pg, canaleta 11: 3,0 pg, canaleta 12: 1,50 pg, canaleta 13: 0,75 pg, canaleta 14: 0,38 pg e canaleta 15: marcador de tamanho molecular de 100pb. **B:** Canaleta 1 a 7: DNA de *C. trachomatis*. Canaleta 1: 0,19 pg, canaleta 2: 0,095 pg, canaleta 3: 0,048 ng, canaleta 4: 0,024 ng, canaleta 5: 0,012 pg, canaleta 6: 0,006 pg, canaleta 7: Controle Positivo para *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* e β -globina. A: 110 pb do gene da β -globina, b: 201 pb do plasmídeo críptico da *C. trachomatis*, c: 260 pb da porina de *N. gonorrhoeae* e d: 648 pb do gene 16S de *N. gonorrhoeae*, canaleta 8: controle negativo e canaleta 9: marcador de tamanho molecular de 100pb.

5.2 CONCORDÂNCIA ENTRE AS METODOLOGIAS EMPREGADAS PCR-MULTIPLES IN HOUSE, XPERT CT/NG E XGEN MULTI UP PARA DETECÇÃO DE *C. TRACHOMATIS* E *N. GONORRHOEAE*

Para estimar o grau de concordância entre PCR-multiplex *in house* e o kit Xpert CT/NG foi realizado o teste Kappa. A concordância entre PCR-multiplex *in house* e o Xpert CT/NG foi razoável para a detecção de *C. trachomatis* (**Tabela 2**) e *N. gonorrhoeae* (**Tabela 3**).

Tabela 2. Concordância entre PCR-multiplex *in house* e o kit Xpert CT/NG para detecção de *C. trachomatis*

	Xpert CT/NG		Total	Concordância*
	Não detectado	Detectado		
PCR-multiplex (100)	55	45		
Não detectado	61,4% (54)	38,6% (34)	100% (88)	Razoável
Detectado	8,3% (1)	91,7% (11)	100% (12)	

***Kappa: 0,242; p= 0,001; IC 95% (0,000-0,001)**

Tabela 3. Concordância entre PCR-multiplex *in house* e o kit Xpert CT/NG para detecção de *N. gonorrhoeae*

	Xpert CT/NG		Total	Concordância*
	Não detectado	Detectado		
PCR-multiplex <i>in house</i> (100)	89	11		
Não detectado	90,8% (89)	9,2% (9)	100% (98)	Razoável
Detectado	0,0% (0)	100% (2)	100% (2)	

***Kappa: 0,283; p< 0,001; IC 95% (0,007-0,012)**

5.2.1 Concordância entre PCR-multiplex *in house* e o kit comercial XGEN Multi UP para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*

Para estimar o grau de concordância entre PCR-multiplex *in house* e o XGEN Multi UP foi realizado o teste Kappa. A concordância entre PCR-multiplex *in house* e o XGEN Multi UP foi boa para a detecção de *C. trachomatis* (Tabela 4) e pobre para *N. gonorrhoeae* (Tabela 5).

Tabela 4. Concordância entre PCR-multiplex *in house* e o kit XGEN Multi UP para detecção de *C. trachomatis*

	XGEN Multi UP		Total	Concordância*
	Não detectado	Detectado		
PCR-multiplex <i>in house</i> (100)	83	17		
Não detectado	92,0% (81)	8,0% (7)	100% (88)	Boa
Detectado	16,7% (2)	83,3% (10)	100% (12)	

*Kappa: 0,639; p< 0,001; IC 95% (0,000-0,000)

Tabela 5. Concordância entre PCR-multiplex *in house* e o kit XGEN Multi UP para detecção de *N. gonorrhoeae*

	XGEN Multi UP		Total	Concordância*
	Não detectado	Detectado		
PCR-multiplex <i>in house</i> (100)	74	26		
Não detectado	75,5% (74)	24,5% (24)	100% (98)	Pobre
Detectado	0,0% (0)	100,0% (2)	100% (2)	

*Kappa: 0,110; p< 0,044; IC 95% (0,058-0,070)

5.2.2 Concordância entre os kits comerciais Xpert CT/NG e XGEN Multi UP para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*

Para estimar o grau de concordância entre os kits comerciais Xpert CT/NG e XGEN Multi UP foi realizado o teste Kappa. A concordância entre o XGEN Multi UP e o Xpert CT/NG foi razoável para a detecção de *C. trachomatis* (Tabela 6) e de *N. gonorrhoeae* (Tabela 7).

Tabela 6. Concordância entre os kits comerciais XGEN Multi UP e Xpert CT/NG para detecção de *C. trachomatis*

	Xpert CT/NG		Total	Concordância*
	Não detectado	Detectado		
XGEN Multi UP (100)	55	45		
Não detectado	65,1% (54)	34,9% (29)	100% (83)	Razoável
Detectado	5,9% (1)	94,1% (16)	100% (17)	

***Kappa: 0,358; p< 0,001; IC 95% (0,000-0,000)**

Tabela 7. Concordância entre os kits comerciais XGEN Multi UP e Xpert CT/NG para detecção de *N. gonorrhoeae*

	Xpert CT/NG		Total	Concordância
	Não detectado	Detectado		
XGEN Multi UP (100)	89	11		
Não detectado	94,6% (70)	5,4% (4)	100% (74)	Razoável
Detectado	73,1% (19)	26,9% (7)	100% (26)	

***Kappa: 0,265; p< 0,001, IC 95% (0,004-0,008)**

5.2.3 Desempenho dos testes moleculares

Para *C. trachomatis*, do total das 47 amostras positivas, dez foram detectadas nas três metodologias, seis foram detectadas nos Kit Xpert CT/NG e XGEN Multi UP, uma no Xpert CT/NG e na PCR-multiplex *in house*; 28 amostras foram detectadas somente no Xpert CT/NG, uma somente no XGEN Multi UP e uma somente na PCR-multiplex *in house* (**Figura 15A**).

Para *N. gonorrhoeae*, considerando todos os resultados 30 amostras foram positivas para pelo menos uma das metodologias. Apenas duas foram detectadas pelas três metodologias, cinco foram detectadas por dois testes (Xpert CT/NG e XGEN Multi UP), quatro amostras apenas pela metodologia referência Xpert CT/NG e 19 somente no XGEN Multi UP (**Figura 15B**).

Figura 15. Concordância das amostras positivas para *C.trachomatis* (A) e *N. gonorrhoeae* (B).

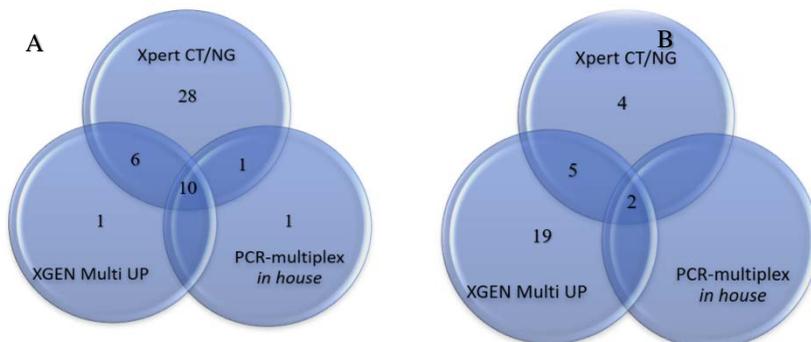


Diagrama de Venn demonstrando a concordância entre as amostras positivas para o PCR-multiplex *in house*, XGEN Multi UP (XGEN) com o Xpert CT/ NG (Cepheid).

Os valores da média, mediana, moda e intervalo do *cycle threshold* (CT) das amostras positivas para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* nos kits comerciais estão descritas na Tabela 8 e Tabela 9, respectivamente. Foi observado, que os valores da média, mediana, moda e intervalo do CT tanto para *C. trachomatis* quanto para *N. gonorrhoeae* foi menor quando as amostras foram positivas para todas as metodologias.

Tabela 8. Descrição da média, mediana, moda e intervalo do cycle threshold (CT) para as amostras que foram positivas para *C. trachomatis*.

	Xpert CT/NG XGEN Multi UP PCR-multiplex <i>in house</i>	Xpert CT/NG XGEN Multi UP	Xpert CT/NG	XGEN Multi UP
Média	25	36	37	39
Mediana	23,5	36	37	39
Moda	20	36	36 e 39	39
Intervalo	19 - 37	33 - 38	31 - 39	39

Na primeira coluna estão descritos valores para amostras que foram positivas para *C. trachomatis* nas três metodologias; na segunda coluna, estão descritos valores para amostras que foram positivas para *C. trachomatis* nos kits comerciais; nas colunas três e quatro estão descritos valores referentes às

amostras que foram positivas para *C. trachomatis* somente no kit Xpert CT/NG e somente no kit XGEN Multi UP, respectivamente.

Tabela 9. Descrição da média, mediana, moda e intervalo do *cycle threshold* (CT) para as amostras que foram positivas para *N. gonorrhoeae*

	Xpert CT/NG XGEN Multi UP	Xpert CT/NG XGEN Multi UP	Xpert CT/NG	XGEN Multi UP
PCR-multiplex in house				
Média	21	36	38	35
Mediana	18,5	36	37	35
Moda	17	36	36	34
Intervalo	17 - 28	31 - 39	36 - 45	30 - 39

Na primeira coluna estão descritos valores para amostras que foram positivas para *N. gonorrhoeae* nas três metodologias; na segunda coluna, estão descritos valores para amostras que foram positivas para *N. gonorrhoeae* nos kits comerciais; nas colunas três e quatro estão descritos valores referentes às amostras que foram positivas para *N. gonorrhoeae* somente no kit Xpert CT/NG e somente no kit XGEN Multi UP, respectivamente.

5.3 SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN DA PCR-MULTIPLEX IN HOUSE PARA DETECÇÃO DE *C. TRACHOMATIS* E *N. GONORRHOEAE*

A sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da PCR-multiplex *in house* para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, foi calculado adotando-se o kit Xpert CT/NG como padrão ouro. Para detecção de *C. trachomatis*, a sensibilidade foi baixa (24,4%), a especificidade foi 98,2%; para *N. gonorrhoeae* a sensibilidade foi extremamente baixa (18,2%) enquanto a especificidade foi de 100,0% (Tabela 10).

5.4 SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VPP E VPN DO KIT XGEN MULTI UP PARA DETECÇÃO DE *C. TRACHOMATIS* E *N. GONORRHOEAE*

A sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do kit XGEN Multi UP para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, foi calculado adotando-se o kit Xpert CT/NG como padrão ouro. Para detecção de *C. trachomatis*, a sensibilidade foi baixa (35,6%) e a especificidade foi de 98,2%; para *N. gonorrhoeae* a sensibilidade foi de 63,6% e a especificidade de 78,6% (Tabela 10).

Tabela 10. Sensibilidade, especificidade e VPP e VPN do kit XGEN Multi UP e da PCR-multiplex *in house*

	XGEN Multi UP		PCR-multiplex <i>in house</i>	
	CT	NG	CT	NG
Sensibilidade	35,6%	63,6%	24,4%	18,2%
Especificidade	98,2%	78,6%	98,2%	100%
VPP	94,1%	26,9%	91,7%	100%
VPN	65,0%	94,6%	61,4%	90,8%

VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, CT: *C. trachomatis* e NG: *N. gonorrhoeae*.

5.5 PREVALENCIA DA INFECÇÃO POR *C. TRACHOMATIS*, *N. GONORRHOEAE* E DA COINFECÇÃO *C. TRACHOMATIS* E *N. GONORRHOEAE*

Foram analisadas amostras de raspado cervical de 99 gestantes com média de idade de 27 anos (14-49 anos) e uma secreção ocular de recém-nascido. A faixa de idade inferior ou igual a 24 (≤ 24 anos) representou 37,4% (n=37) das gestantes enquanto a faixa etária com idade superior ou igual a 25 anos (≥ 25 anos) representou 63,6% (n=63). A prevalência de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e da coinfeção *C. trachomatis/N. gonorrhoeae* em gestantes de acordo com o teste utilizado está descrito na Tabela 11. Para fins epidemiológicos foi adotada a prevalência da infecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* pelo kit comercial Xpert CT/NG, único teste do estudo aprovado pelo FDA. A infecção por *C. trachomatis* foi estatisticamente associada a gestantes com idade ≤ 24 anos ($p=0,038$) (Tabela 12), RC: 2,5 (IC 95%: 1,080- 5,729; $p= 0,032$). Não foi observada associação entre a infecção por *N. gonorrhoeae* e gestantes com idade ≤ 24 anos (Tabela 13). Não foi observada associação significativa entre a presença da infecção por *N. gonorrhoeae* e da infecção por *C. trachomatis* (Tabela 14). A amostra de secreção ocular do recém-nascido foi reagente para *N. gonorrhoeae* e não reagente para *C. trachomatis* em todas as metodologias.

Tabela 11. Prevalência da infecção por *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e da coinfeção *C. trachomatis/N. gonorrhoeae* em gestantes de acordo com o teste utilizado

Teste	CT	NG	Coinfeção CT/NG
PCR-multiplex <i>in house</i>	12,1%	1,0%	0,0%
Xpert CT/NG	45,5%	10,1%	3,0%
XGEN multi UP	17,2%	25,3%	4,0%

CT: *C. trachomatis*. NG: *N. gonorrhoeae*

Tabela 12. Associação da infecção por *C. trachomatis* de acordo com a faixa etária

	<i>C. trachomatis</i>		Total	p*
	Não detectado	Detectado		
Idade (99)	54	45		
≤ 24 anos	40,5% (15)	59,5% (22)	100% (37)	0,038
≥ 25 anos	62,9% (39)	45,5% (23)	100% (62)	

*Valores de p para teste Qui-Quadrado.

Tabela 13. Associação da infecção por *N. gonorrhoeae* em gestantes de acordo com a faixa etária.

	<i>N. gonorrhoeae</i>		Total	p*
	Não detectado	Detectado		
Idade (99)	89	10		
≤ 24 anos	97,3% (36)	2,7% (1)	100% (37)	0,085
≥ 25 anos	85,5% (53)	14,5% (9)	100% (62)	

*Valores de p para teste Qui-Quadrado.

Tabela 14. Coinfecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*

	<i>N. gonorrhoeae</i>		Total	p*
	Não detectado	Detectado		
<i>C. trachomatis</i> (99)	89	10		
Não detectado	87,0% (47)	13,0% (7)	100% (54)	0,340
Detectado	93,3% (42)	6,7% (3)	100% (45)	

*Valores de p para teste Qui-Quadrado.

6 DISCUSSÃO

Em 2014, quando começaram as coletas do protocolo de bolsa rota no HU/UFSC, o laboratório disponibilizou *swab* com meio de *Amies* e carvão, promoveu capacitação de pessoas e distribuiu instruções por escrito detalhando as técnicas apropriadas de coleta e transporte de amostras para cultura de *N. gonorrhoeae*. No entanto, entre as amostras das gestantes enviadas ao laboratório para cultura de *N. gonorrhoeae* desde então, somente uma apresentou resultado positivo. A ausência de crescimento em cultura pode ser em função de o microrganismo ser extremamente fastidioso, e perder a viabilidade em decorrência de problemas de coleta e/ou transporte das amostras, ou ainda, devido a competição com a microbiota colonizante da endocervice. Nesse contexto, o presente estudo propôs o desenvolvimento e a avaliação de uma PCR-multiplex *in house* para detecção simultânea de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*, utilizando o banco de amostras enviadas ao laboratório para pesquisa de clamídia.

A detecção direta de ácidos nucleicos específicos de patógenos que causam IST, utilizando diferentes NAATs tornou-se o novo “padrão ouro” para o diagnóstico de muitas ISTs, incluindo clamídia e gonorreia, devido à sua sensibilidade e especificidade superiores (WHO, 2013). Diferentes estudos vêm demonstrando que os NAATs possuem melhor desempenho do que outros testes disponíveis para detecção de *C. trachomatis* e de *N. gonorrhoeae* (BLACK et al., 2002; BRISTOW et al., 2017; GAYDOS et al., 2003; GAYDOS et al., 2004; VAN-DER-POL et al., 2000). O teste Aptima Combo 2[®] (Hologic), um NAAT para diagnóstico de infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, têm sido utilizado em estudos internacionais como referência para detecção de infecção genital e extragenital (BRISTOW et al., 2017; DANBY et al., 2016; GRATRIX et al., 2015). Atualmente esse kit não está comercialmente disponível no Brasil, razão pela qual foi adotado como teste de referência o kit Xpert[®] CT/NG (Cepheid), um teste aprovado pelo FDA para a detecção de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*, e validado em estudos de comparação com o Aptima Combo 2. Para amostras endocervicais a sensibilidade do Xpert[®] CT/NG (Cepheid) utilizando o Aptima Combo 2 como referência, variaram entre 97,3% (GAYDOS et al., 2013) a 97,4% (GAYDOS, 2014) para detecção de *C. trachomatis* e 100,0% para *N. gonorrhoeae* (GAYDOS et al., 2013; GAYDOS, 2014); para amostras de *swab* vaginal, a sensibilidade para *C. trachomatis* variou de 98,7% (GAYDOS, 2014) a 100% (GAYDOS et al., 2013) e 100,0% para *N. gonorrhoeae* (GAYDOS et al., 2013;

GAYDOS, 2014); para urina masculina, a sensibilidade tanto para *C. trachomatis* quanto para *N. gonorrhoeae* variaram entre 97,5% (GAYDOS et al., 2013) e 98,0% (GAYDOS, 2014). A especificidade para os tipos de amostras analisadas foi superior ou igual a 99,4% para *C. trachomatis* e superior ou igual a 99,9% para *N. gonorrhoeae* (GAYDOS et al., 2013; GAYDOS, 2014). Em amostras extragenitais, os testes de validação do Xpert® CT/NG (Cepheid) frente ao Aptima Combo 2 mostraram uma menor sensibilidade, 86% a 88,2% para *C. trachomatis* em amostras retais e 50% em amostras faríngeas, e para *N. gonorrhoeae*, 91,1% para amostras retais e 77,8% para amostras faríngeas, todos com boa especificidade (92,2 – 100%) (GOLDENBERG et al., 2012; GEIGER et al., 2016). Estudo recente mostrou uma concordância de 97,7% entre os resultados de ambas as metodologias utilizando amostras extragenitais (BRISTOW et al., 2017). O alto desempenho para a detecção de infecções urogenitais, e os bons resultados para amostras retais e de faringe, asseguram a escolha desse teste como referência para a avaliação da PCR-multiplex *in house* e do ensaio XGEN Multi UP (XGEN) em amostras endocervicais no presente estudo.

Os NAATs *in-house* geralmente dispõem de alta sensibilidade e especificidade, além de apresentarem menor custo, podendo constituir uma opção oportuna, principalmente, em locais com pequenas rotinas e recursos financeiros escassos (WHO, 2013). No entanto, estudos mostram que variabilidade nas sequências alvo podem ter impacto sobre a sensibilidade dos métodos *in house*. O gene *opa* e o pseudogene *porA*, este último utilizado no presente estudo como um dos alvos na PCR-multiplex *in house*, são alvos comuns em testes *in house* para o diagnóstico de *N. gonorrhoeae*, apresentando bons resultados tanto em combinação como individualmente (GOIRE et al., 2008; WHILEY et al., 2008). O pseudogene *porA* é altamente específico para *N. gonorrhoeae*, uma vez que não está presente em espécies de *Neisseria* comensais e mostra-se bem diferente em *N. meningitidis*. No entanto, estudo descreveu resultados falso negativos devido mutações genéticas em isolados de *N. gonorrhoeae* que geraram variantes de *porA* ou *opa*, que não são detectadas em alguns testes moleculares *in house* (WHILEY 2011). O monitoramento contínuo dos isolados circulantes permite avaliar variações genéticas nas sequências alvo utilizadas em NAAT, sendo considerado crítico para a acurácia dos testes e deve ser frequentemente realizado (WHILEY, LAHRA 2015). Além disso, estudos descreveram isolados raros de *N. gonorrhoeae* contendo pseudogene *porA* meningocócico no lugar do *porA* gonocócico,

resultando em NAATs com resultados falso-negativos. Esses isolados foram reportados inicialmente na Austrália e subsequentemente na Escócia, Suécia e Inglaterra (WHILEY et al., 2011 ; ISON et al., 2013).

No presente estudo, a avaliação do desempenho da PCR multiplex *in house* revelou uma alta sensibilidade analítica para detecção simultânea de *N. gonorrhoeae* ($1,90 \times 10^4$ cópias de DNA) e *C. trachomatis* ($1,56 \times 10^3$ cópias de DNA). Contudo quando foi comparado aos resultados de amostras clínicas com o teste Xpert® CT/NG (Cepheid), o teste de concordância mostrou resultados razoáveis tanto para *C. trachomatis* (Kappa: 0,242) quanto para *N. gonorrhoeae* (Kappa: 0,283). Apesar da baixa sensibilidade para detecção de *C. trachomatis* (24,4%) e *N. gonorrhoeae* (18,2%), o teste *in house* apresentou especificidade superior a 98,0% para ambos os alvos (98,2% para *N. gonorrhoeae* e 100% para *C. trachomatis*).

O kit comercial XGEN Multi UP (XGEN) possui registro na ANVISA para utilização no diagnóstico de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* no Brasil, no entanto, não é aprovado pelo FDA. Por este motivo, o desempenho do teste também foi avaliado frente ao teste Xpert® CT/NG (Cepheid). A sensibilidade tanto para detecção de *C. trachomatis* quanto de *N. gonorrhoeae* foram baixas (35,6% e 63,6% respectivamente), porém superiores a PCR-multiplex *in house* (24,4% e 18,2%, respectivamente). A especificidade foi de 98,2% para *C. trachomatis* e de 78,6% para *N. gonorrhoeae*. O grau de concordância entre os ensaios foi razoável tanto para detecção de *C. trachomatis* (Kappa: 0,358) quanto para *N. gonorrhoeae* (Kappa: 0,265).

Apesar da ausência de um padrão de critério para avaliação dos NAATs, o CDC, recomenda que os NAATs devam oferecer sensibilidades de detecção bastante expandidas, geralmente bem acima de 90%, mantendo alta especificidade (usualmente $\geq 99\%$) (CDC 2014). Entretanto, a prevalência de *N. gonorrhoeae* na população é um fator importante para ensaios de validação de testes e deve ser considerada, pois afetará diretamente o VPP do ensaio, e dessa forma o número de resultados falso positivos obtidos. Segundo a OMS (2013), um VPP superior a 90% é o requisito mínimo para aprovar a utilização de um NAAT para a detecção de *N. gonorrhoeae* em um ensaio simples ou multiplex. É importante ressaltar que, mesmo em situações onde a sensibilidade e a especificidade do teste são superiores a 95%, uma população com prevalência de até 5% de gonorreia, o teste ainda apresentará um VPP inferior a 90%, enquanto que, em uma prevalência de 10%, o VPP da maioria dos NAAT será maior que 90%. Por esse motivo, a OMS recomenda o uso de NAATs aprovados

internacionalmente para o diagnóstico clínico, ou quando não for possível, principalmente em países em desenvolvimento, recomenda a validação do ensaio com pelo menos um NAAT internacionalmente aprovado (WHO, 2013).

No presente estudo, embora o VPP da PCR multiplex *in house* apresentou-se superior a 90,0% tanto para *C. trachomatis* quanto para *N. gonorrhoeae*, a sensibilidade para ambos os alvos foi muito baixa (24,4% para *C. trachomatis* e 18,2% para *N. gonorrhoeae*). O XGEN Multi UP (XGEN) apresentou VPP superior a 90,0% somente para *C. trachomatis* e sensibilidade e especificidade inferior a 64,0% para ambos os alvos. Além disso, o VPN foi baixo para *C. trachomatis* em ambas as metodologias, o que não garante que as amostras negativas sejam verdadeiramente negativas para o microrganismo.

O diagrama de Venn também foi utilizado para avaliar a concordância entre os resultados das amostras positivas para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* obtidas pela PCR multiplex *in house* e o kit XGEN Multi UP (XGEN) frente aos resultados observados no ensaio Xpert[®] CT/NG (Cepheid). Para *N. gonorrhoeae*, 30 amostras foram positivas por pelo menos uma metodologia, destacando 19 amostras positivas somente no XGEN Multi UP e quatro positivas somente pela metodologia de referência (**Figura 15**). Assim, o kit XGEN Multi UP apresentou 19,0% de resultados falso positivos com VPP de 26,9%, além disso, não teve sensibilidade para detectar quatro verdadeiros positivos com VPN de 94,6%. Por outro lado, a PCR multiplex *in house* detectou somente dois isolados, que também foram positivos para as outras duas metodologias, apresentando um VPP de 100% mas um VPN de apenas 90,8%, com baixíssima sensibilidade (18,2%). A baixa sensibilidade para detecção de *N. gonorrhoeae* da PCR multiplex *in house* pode ser evidenciada na tabela 9, que apresenta os valores do ciclo de quantificação para as amostras positivas, com uma mediana de 18,5 ciclos para todas as PCRs nas amostras detectadas por essa metodologia, correspondendo capacidade de detecção apenas em amostras com maior carga bacteriana.

Resultados falso positivos em NAATs para *N. gonorrhoeae* podem ocorrer devido a frequente troca horizontal de genes dentro do gênero *Neisseria*, principalmente pela aquisição de genes por espécies comensais. Neste contexto, o teste COBAS Amplicor, que apresenta como alvo uma citosina metiltransferase, pode apresentar reação cruzada com *N. cinerea*, *N. flavescens*, *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. subflava*, e o teste ProbTec BD, que apresenta como alvo o gene de uma proteína homóloga a pilina, pode apresentar reação cruzada com *N.*

flavescens, *N. lactamica*, *N. subflava*, e *N. cinerea*. (WHILEY et al., 2006). Além disso, resultados falso positivos têm sido associados a reações cruzadas com espécies de *Neisseria* comensais, em ensaios *in house* que utilizam o DNA ribossomal 16S como alvo para detecção do microrganismo. (SOOD et al., 2014). No entanto, o teste comercial referência para detecção de *N. gonorrhoeae* (Aptima COMBO 2) que tem como alvo o RNA 16S ribossomal, não apresentou descrição de reações cruzadas com espécies comensais (WHILEY et al., 2006, TABRIZI et al., 2011). Por outro lado, o teste comercial Abbott LCx, que tem como alvo o gene *opa*, mesmo alvo do XGEN Multi UP, também não apresentou descrição de reações cruzadas com outras espécies de *Neisseria* (WHILEY et al., 2006, TABRIZI et al., 2011).

Apesar da presença de espécies comensais de *Neisseria* ser mais comum em amostras extragenitais, especialmente orofaringe, estes microrganismos também podem fazer parte da microbiota urogenital. A presença de outras espécies de *Neisseria* pode reduzir a especificidade dos NAATS, particularmente para amostras de faringe e o reto. (BENNETT et al., 2017; CDC, 2014b; PALMER et al., 2003). A especificidade dos NAATs varia conforme a plataforma utilizada, sendo que os testes mais novos melhoraram a sensibilidade em comparação com testes anteriores. Com objetivo de avaliar a especificidade de kits comerciais, Tabrizi e colaboradores (2011) utilizaram 450 diferentes isolados clínicos de cultura, incluindo neisserias não gonocócicas (*N. meningitidis* e espécies comensais) e espécies de *Moraxella*, verificando a ocorrência de reações cruzadas. No ensaio, os sistemas COBAS Amplicor, BD ProbeTec apresentaram maior número de resultados falso positivos, com 14,1% (33 isolados) e 11% (26 isolados), respectivamente. A maior proporção de reações cruzadas (falso positivo) para o sistema Cobas Amplicor ocorreu com isolados de *N. meningitidis* (13/75), e para o sistema BD Probe Tec com isolados de *N. lactamica* (18/30), sendo que o sistema COBAS apresentou reação cruzada com 14 das 18 espécies de *Neisseria* testadas. Os sistemas APTIMA COMBO 2, Abbott RealTime e COBAS 4800 apresentaram reações cruzadas em menos que 2% dos isolados, e quando submetidos a retestagem não confirmaram os resultados falso positivos (TABRIZI et al., 2011).

Recentemente, o sequenciamento do genoma completo tem sido empregado no estudo da epidemiologia e disseminação da resistência. Estudos têm demonstrado que amostras provenientes de infecções genitais por *N. meningitidis* são frequentemente diagnosticadas erroneamente como infecções por *N. gonorrhoeae* quando se utilizam ensaios baseados em amplificação de ácidos nucleicos (CDC, 2014;

HARRISON et al., 2017; QUILLIN; SEIFERT, 2018; SILVA et al., 2016).

Resultados falso positivos levaram a publicação do artigo “surto ou ilusão” por Bennetti e colaboradores (2016), após a introdução de NAAT no serviço de IST em Oxford, Inglaterra. As taxas de resultados falso-positivos pelo sistema BD Viper para *N. gonorrhoeae* chegaram a 27,0% para amostras femininas, 13,2% para amostras de homens heterossexuais, 3,5% para amostras ano genitais e 62,8% para amostras de faringe oriundas de HSH. Com a realização de testes confirmatórios por PCR em tempo real utilizando iniciadores para o pseudogene *porA* e para o gene *opa* em laboratório de referência, os resultados discrepantes, principalmente em amostras da faringe de HSH e cervico-vaginais, foram considerados falso positivos. Os resultados não confirmados como positivos para *N. gonorrhoeae* ocorreram em uma população de baixa prevalência da infecção, utilizando um teste com fortes evidências de reatividade cruzada com espécies de *Neisseria* comensais. (TABRIZI et al., 2011). A utilização de testes complementares em amostras positivas para *N. gonorrhoeae* por NAAT, independentemente do tipo de amostra, podem ser essenciais, particularmente em populações de baixa prevalência. (GOLPARIAN et al., 2015). Além disso, coleta de amostras de múltiplos sítios potencialmente positivos para infecção, parece tornar mais fidedigno o diagnóstico (verdadeiro positivo), sendo essa prática recomendada por alguns autores (BENNETT et al., 2017).

O gene *opa*, alvo da reação XGEN Multi UP, foi inicialmente validado para detecção de *N. gonorrhoeae* em 2005, localizado em região conservada do genoma, pode estar presente em 11 ou mais loci ao longo de 60% do genoma gonocócico (TABRIZI et al., 2005). O número de cópias aumentado aumenta a sensibilidade e diminui a probabilidade de resultados falsos negativos devido a deleções ou variabilidade genética entre os isolados. No ensaio de validação da reação, a especificidade e sensibilidade foram avaliadas utilizando 173 culturas de microrganismos incluindo 100 isolados de *N. gonorrhoeae*, 10 de *N. meningitidis* e 63 de diferentes espécies comensais, além de 135 amostras clínicas previamente positivas por outros NAATs. (TABRIZI et al., 2005). No estudo, que apresentou 99 % de sensibilidade nos testes com isolados clínicos e 100% de especificidade, a curva de amplificação mostrou que diluições com 10.000 cópias de *N. gonorrhoeae* eram detectadas entre 20 e 25 ciclos, com 10 cópias em aproximadamente 35 ciclos, com uma cópia em 40 ciclos. Segundo a bula do kit XGEN Multi UP a sensibilidade do teste é de 1.000 cópias/ml, extrapolando os resultados para a curva de amplificação do estudo inicial, essa

amplificação aconteceria entre 25 e 30 ciclos. No presente estudo, as 19 amostras positivas para *N. gonorrhoeae* exclusivamente pela metodologia XGEN apresentaram intervalo de quantificação entre 30-39 ciclos, e o intervalo para as amostras positivas por duas metodologias (Xpert CT/NG e XGEN Multi UP) variaram entre 31-39 ciclos (Tabela 8), não permitindo delimitar um ponto de corte baseado em intervalo de quantificação para separar verdadeiros positivos de falso positivos. Baseado na literatura, também não é possível associar a baixa especificidade encontrada no presente estudo para o kit XGEN com o gene *opa*, alvo da reação, por possível ocorrência de reações cruzadas com espécies comensais de *Neisseria* (TABRIZI et al., 2005; TABRIZI et al., 2011). No entanto, a baixa especificidade do teste poderia estar associada às condições da reação, especialmente ao fato de utilizar múltiplos alvos para diferentes microrganismos.

Atualmente, a OMS (WHO, 2013), o *Public Health England e a British Association of Sexual Health and HIV* (BASHH) (BASHH, 2012), recomendam a utilização de testes confirmatórios usando um segundo alvo de ácido nucléico para o diagnóstico de *N. gonorrhoeae*, especialmente em locais de baixa prevalência da infecção e para amostras extragenitais. Esta recomendação é baseada em estudos que demonstram à reatividade cruzada dos NAATs com espécies comensais de *Neisseria*, tendo como objetivo melhorar o VPP do diagnóstico. (ALEXANDER, 2009; BENNETT et al., 2017; COOK et al., 2005; MCNALLY et al., 2008; PALMER et al., 2003; TABRIZI et al., 2011, 2013; WHILEY et al., 2008). O teste Xpert CT/NG já utiliza diferentes alvos para *N. gonorrhoeae* na mesma reação, considerando positivas apenas amostras que amplificam para os dois alvos simultaneamente. A utilização de um único alvo, e a não realização de testes confirmatórios em locais de baixa prevalência pode levar a diagnósticos inadequados, tratamento desnecessário e superestimação da prevalência na população. (FIELD et al., 2015).

A PCR para *C. trachomatis*, utilizando como alvo o plasmídeo críptico, foi introduzida na DACL do Hospital Universitário/UFSC no ano de 2015, substituindo o teste de Imunofluorescência direta (IFD), após validação por um projeto de mestrado do nosso grupo de pesquisa (VIEIRA, 2016). No projeto piloto, durante os anos de 2014 e 2015, foram coletadas 124 amostras endocervicais pareadas para realização da pesquisa de *C. trachomatis* por PCR e por IFD. Como resultado 11 amostras foram positivas por PCR (8,9%), e apenas duas destas amostras foram detectadas por IFD (1,6%). O projeto foi ampliado com mais 128 amostras endocervicais de gestantes, com uma positividade de 11,7%

(15/128) por metodologia de PCR. No presente estudo, que utilizou os mesmos iniciadores para plasmídeo críptico na reação Multiplex *in house* em amostragem endocervical de gestantes, a prevalência foi de 12,1%, muito semelhante ao observado em 2015 por Vieira na mesma população. Considerando os resultados da metodologia XGEN multi UP, a prevalência sobe para 17,2%, e com os resultados da metodologia referência Xpert CT/NG, a prevalência de infecção por *C. trachomatis* entre as gestantes de alto risco atendidas no HU/UFSC foi de 45,5%.

De acordo com os resultados de concordância para a detecção de *C. trachomatis* observados no diagrama de Diagrama de Venn, 47 amostras apresentaram resultado positivo por pelo menos uma metodologia. Destaque para 28 amostras que foram positivas somente pelo sistema Xpert® CT/NG (Cepheid), representando 59,6% das amostras positivas (28/47). Apenas 21,3% dos resultados positivos (10/47) amplificaram pelas três metodologias, sendo 14,0% (7/47) positivos por dois testes, 12,8% (6/47) pelos testes Xpert® CT/NG e XGEN, e 2,1% (1/47) pelos testes Xpert® CT/NG e PCR multiplex *in house* (**Figura 15**). Avaliando o intervalo do ciclo de quantificação, foi possível constatar que as amostras positivas pelas três metodologias apresentavam uma carga bacteriana relativamente maior, com mediana de amplificação em 23,5 ciclos. Em amostras com menor quantidade de cópias de *C. trachomatis* a capacidade de detecção do teste Xpert CT/NG foi muito superior aos demais, mediana de amplificação de 37 ciclos para amostras positivas somente por essa metodologia. Apesar da baixa sensibilidade para detecção de *C. trachomatis* (35,6% e 24,4%, respectivamente), os testes XGEN e Multiplex *in house*, apresentaram alta especificidade (98,2%), com bons VPP (Tabela 10).

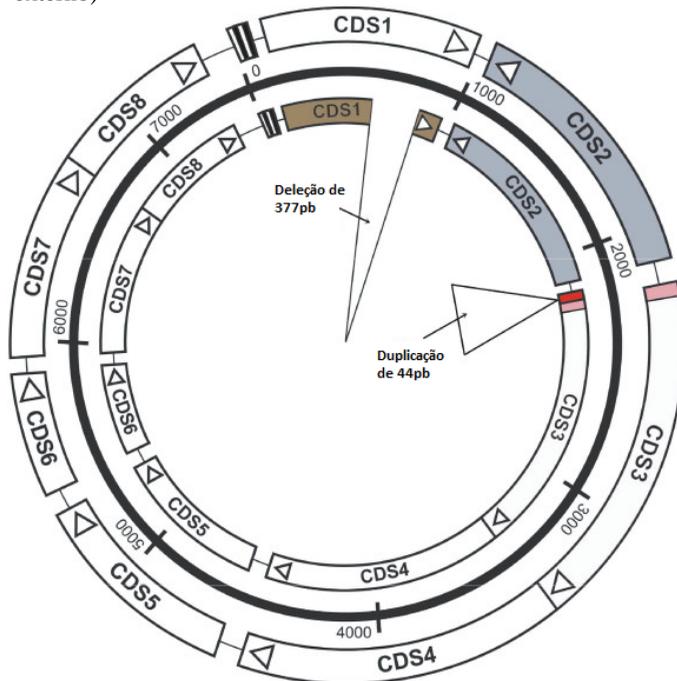
Para *C. trachomatis*, os NAATs que utilizam genes com mais de uma cópia possuem sensibilidade superior aos demais testes, como o RNAr e o plasmídeo críptico da *C. trachomatis*, o qual está presente na ordem de sete a 10 cópias por corpo elementar (MANAVI, 2006). Por possuir um número maior de cópias, o plasmídeo críptico foi eleito como alvo para a PCR *in house* utilizada atualmente no HU/UFSC.

Uma variante de *C. trachomatis* reportada em 2006 na Suécia (nvCT: nova variante de *C. trachomatis*) com uma deleção de 377 bp na primeira sequência de codificação do plasmídeo críptico, um dos alvos utilizados em reações de PCR, resultando em testes falso negativos para alguns NAATs comerciais (RIPA; NILSSON, 2006; SETH-SMITH et al., 2009; UNEMO et al., 2010). Esta nova cepa circulou principalmente em países escandinavos, disseminando-se na população provavelmente por seleção devido à falha no diagnóstico (UNEMO et al., 2010). As

novas plataformas comerciais que utilizavam a região deletada do plasmídeo foram redesenhadas para mitigar a falha na detecção desses isolados. Análises comparativas das sequências dos plasmídeos revelou regiões mais conservadas que deveriam ser utilizadas para desenhar futuros iniciadores para testes de amplificação de ácidos nucleicos (SETH-SMITH et al., 2009). As plataformas Real-Time CT/NG (Abbott), BD Probe TEC (BD) e Cobas c4800 Real Time PCR (Roche), que utilizam o plasmídeo críptico como alvo para detecção de *C. trachomatis*, foram todas atualizadas para detectar a cepa nvCT (NWOKOLO et al., 2016).

Alguns isolados de *C. trachomatis* livres de plasmídeo têm sido descritos, mas são extremamente raros. Isolados clínicos viáveis descritos como livres de plasmídeo pertencem aos sorotipos L2, D e E, sugerindo que o plasmídeo não é essencial para a sobrevivência da bactéria (FARENCENA et al., 1997; STOTHARD et al., 1998). Os plasmídeos sequenciados até o momento contêm aproximadamente 7kb, com oito sequências de codificação (do inglês, *coding sequences* - CDS), e um conjunto de quatro repetições de 22 pb, que é entendida como a origem de replicação (SETH-SMITH et al., 2009). A deleção que caracteriza a cepa nvCT está localizada em CDS1 (RIPA et al., 2006), mas os iniciadores utilizados na PCR multiplex *in house* deste estudo foram desenhados para a região CDS4 (**Figura 16**). Desta forma, a baixa sensibilidade observada para a multiplex *in house* não pode ser atribuída a uma possível disseminação da cepa nvCT na região metropolitana de Florianópolis.

Figura 16. Comparação entre dois plasmídeos crípticos de *Chlamydia trachomatis* (pSW2, círculo interno e pSW3, círculo externo)



pSW2 carrega uma deleção de 377 pb no CDS1 (cor marrom) e uma duplicação imediatamente antes do CDS3 (em vermelho). CDS2 é transcrito na direção oposta aos outros CDS's e está destacado em cinza. A origem de replicação, composta por um conjunto de 22 pb repetidos, está localizada antes do CDS1. **Fonte:** (SETH-SMITH et al., 2009).

Os testes comerciais diferem em seus métodos de amplificação e nos genes que eles detectam. Os ensaios de segunda geração para detecção de *C. trachomatis* apresentam alta especificidade, garantindo um mínimo de resultados falso positivos (CHERNESKY et al., 2014), assim como os testes em validação por esse estudo. Diferenças na sensibilidade observada na comparação entre testes de segunda geração para amostras de secreção vaginal por autocoleta (Sistema Tigris 98,1% e sistema Panther 96,2%, comparando com o teste Aptima Combo 2 (Hologic Gen Probe); Real Time CT/NG no instrumento m2000

(Abbott) 98%; sistema Viper (BD) para o teste ProbeTec CT/NG 90,6%; teste cobas CT/NG na plataforma 4800 (Roche) 84,6%), são provavelmente determinadas por sensibilidades analíticas e pelos níveis dos alvos de *C. trachomatis* nas amostras clínicas (CHERNESKY et al., 2014). A capacidade de detecção do teste Multiplex *in house* parece estar diretamente relacionada aos níveis ou quantidade de cópias do gene alvo nas amostras clínicas, apresentando resultados positivos somente para amostras que amplificaram em ciclos baixos, sugerindo que a quantidade de alvo foi um fator importante para a baixa sensibilidade observada para teste. Por outro lado, a baixa sensibilidade do ensaio XGEN não mostrou correlação direta com a quantidade de alvo nas amostras, detectando alguns isolados em ciclos elevados. A baixa sensibilidade, portanto, pode estar relacionada à falta de sensibilidade analítica, uma causa possível sendo a grande quantidade de iniciadores/alvos na reação (CHERNESKY, M. et al., 2014).

ISTs curáveis em mulheres grávidas podem levar a vários resultados adversos, incluindo ruptura prematura de membrana, parto prematuro, corioamnionite, baixo peso ao nascer e mortalidade neonatal. A disponibilidade de estudos que comparam as taxas de prevalência de ISTs curáveis em gestantes em várias regiões do mundo é limitada. As práticas de triagem pré-natal para ISTs curáveis em mulheres grávidas, especificamente para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* variam mundialmente, diferindo por país e por IST (JOSEPH DAVEY et al., 2016). A OMS não possui recomendação para triagem de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em gestantes. Nos Estados Unidos, a triagem de gestantes assintomáticas com risco aumentado para infecção por estes dois agentes é um procedimento padronizado (CDC, 2015). Atualmente, a OMS recomenda uma abordagem sindrômica com tratamento presuntivo para mulheres sintomáticas, no entanto, como a maioria das infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em mulheres são assintomáticas, muitos casos de infecções na gestação são perdidos. Esse contexto caracteriza um provável viés de seleção das pacientes do presente estudo, pois foi realizado com pacientes em trabalho de parto prematuro atendidas na emergência obstétrica do Hospital Universitário. Pacientes com ruptura prematura de membrana e parto prematuro possivelmente associados a infecções não detectadas no acompanhamento pré-natal, devido a falta de sintomatologia, e por consequência, não realização do diagnóstico laboratorial.

A variação nos testes diagnósticos utilizados e nas populações testadas dificulta a comparação da prevalência entre os diferentes estudos em regiões distintas ou na mesma região. Este estudo apresenta

exemplos importantes da variação da prevalência segundo a metodologia empregada. O Hospital Universitário que utilizou até 2015 a IFD para diagnóstico de infecções por *C. trachomatis*, teve um importante ganho na sensibilidade metodológica quando substituiu o teste por um NAAT *in house* (Vieira, 2016). No entanto, ao comparar a sensibilidade da metodologia *in house* utilizada atualmente, com duas metodologias comerciais, a metodologia *in house* detectou aproximadamente apenas um quarto das infecções na população estudada (12/47). Tais variações, além de inconsistências entre pesquisa e prática, podem representar o motivo pelo qual a OMS ainda não implementou diretrizes e políticas claras para triagem de outras ISTs, além da sífilis e do HIV na gravidez (LOW et al., 2006; WHO, 2015b). Na maioria dos países desenvolvidos, os NAATs são o padrão ouro de diagnóstico para o rastreamento de clamídia e gonorreia devido à sua ampla disponibilidade, e alta sensibilidade e especificidade (CHERNESKY, M. A., 2005; CHICO et al., 2012; COOK et al., 2005; OTA et al., 2009; PATIL; NAGAMOTI; METGUD, 2012; WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, 2015). No entanto, nos muitos países em desenvolvimento como o Brasil, os sistemas de saúde públicos geralmente não dispõem de testes moleculares, utilizando testes com menor sensibilidade e especificidade ou ainda, o diagnóstico sintomático (CHERNESKY, M. A., 2005; OTA et al., 2009).

Estimativas da OMS sobre infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, entre mulheres podem subestimar a prevalência dessas infecções, particularmente por serem frequentemente assintomáticas. Em 2012 as estimativas de prevalência de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* segundo a OMS eram de 2,6% e 2,3% entre as mulheres na África, e de 7,6% e 0,8% nas Américas (WHO, 2012).

Nos Estados Unidos, em 2016 a prevalência de infecções por *C. trachomatis* entre mulheres jovens sexualmente ativas foi de 4,7%, subindo para 13,5% entre mulheres negras não hispânicas. No período foram reportados aproximadamente 1,6 milhão infecções por *C. trachomatis* (529/100.000 habitantes) e 555 mil casos de infecções por *N. gonorrhoeae* (172/100.000 habitantes), sendo que 45% das infecções por clamídia acometeram mulheres jovens (15/24 anos). O CDC estima que casos não diagnosticados de ISTs causam infertilidade em aproximadamente 20.000 mulheres americanas a cada ano. A prevalência em homens jovens HSH no mesmo período foi de 28,9%, mostrando que a proporção de IST entre a população varia segundo idade, gênero e comportamento sexual (CDC, 2017).

Estudos brasileiros também evidenciam uma importante variação na prevalência de infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* conforme a região, a população estudada e a metodologia utilizada. Em estudo realizado na cidade de Curitiba, a prevalência de infecções por *C. trachomatis* em mulheres não gestantes foi de 10,7% entre jovens assintomáticas (16-23 anos) (PIAZZETTA et al., 2011) e 20,5% entre profissionais do sexo (BALDIN-DAL POGETTO; SILVA; PARADA, 2011). Para *N. gonorrhoeae* as taxas de prevalência na cidade de Salvador variaram de 0,5% entre mulheres que frequentaram clínica de planejamento familiar testadas em 2000 (CODES et al., 2006) a 9,2% entre mulheres HIV positivas testadas entre 2013-2015 (TRAVASSOS et al., 2016).

Estudos da prevalência de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em gestantes têm demonstrado taxas mais elevadas para ambas as infecções nesta população. Uma revisão sistemática em 30 países (2010 e 2015), envolvendo 3.489.621 gestantes revelou uma prevalência média de infecção por *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* de 4,6% e 4,4%, na África do Sul, e 4,2% e 2,3% no Leste da África, respectivamente. Na América Latina, foram incluídos estudos do Peru, Brasil, Equador, Argentina e Guatemala revelando uma prevalência de 11,2% para *C. trachomatis*, e 1,2% para *N. gonorrhoeae*. Na Ásia, a prevalência de *N. gonorrhoeae* foi de 2,8% e de *C. trachomatis* de 0,8% (JOSEPH DAVEY et al., 2016). No Ceará, no ano 2000, a prevalência da infecção por *C. trachomatis* em gestantes foi de 11,0% em Fortaleza e 6,4% em Aracati, enquanto a infecção por *N. gonorrhoeae* foi de 1,2% em ambas as cidades (MARTINS et al., 2004). Entre 2004 e 2005, foi realizado um estudo com 3303 gestantes em seis capitais brasileiras (Manaus, Fortaleza, Goiânia, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre) que descrevem uma taxa de 9,4% para *C. trachomatis*, 1,5% para *N. gonorrhoeae* e 1,0% para coinfeção (JALIL et al., 2008). Seis anos mais tarde, um estudo com 2071 gestantes com idade entre 15 e 24 anos, representantes das cinco regiões do país, revelou uma taxa de infecção por *C. trachomatis* de 9,8% e de 1,0% por *N. gonorrhoeae*, sendo constatado 4,0% de coinfeção (PINTO et al., 2011).

Estudos em população gestante infectada por HIV revelaram taxas particularmente elevadas da prevalência de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* na África do Sul (*C. trachomatis* 21,3% e *N. gonorrhoeae* 7,6%) e no Brasil (*C. trachomatis* 17,1% e *N. gonorrhoeae* 3,4%) (ADACHI et al., 2015). No presente estudo, a prevalência da infecção por *C. trachomatis* foi de 45,5%, e por *N. gonorrhoeae* foi de 10,1%, com 3,0% de coinfeção *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae*, taxas bem

superiores ao descrito nas revisões em pacientes soropositivas para HIV utilizando a mesma metodologia (Xpert CT NG), mas em amostras diferentes (urina e swab cervico-vaginal, respectivamente). No entanto, deve-se levar em consideração que a população estudada é composta por gestantes de alto risco em trabalho de parto prematuro. Considerando que a prevalência das infecções entre mulheres grávidas é mais elevada, e que ISTs em gestantes não tratadas podem resultar em trabalho de parto prematuro, pode-se inferir que a prematuridade nestas pacientes foi associada a infecção por *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae* em mais de 50% dos casos atendidos emergência obstétrica do HU/UFSC no período do estudo.

Os resultados do presente estudo mostram que utilizando a metodologia *in house*, os valores de prevalência para ambas as infecções seriam consideravelmente menores, e as taxas muito semelhantes às descritas em outros estudos brasileiros. Corroborando a complexidade da comparação entre estudos de prevalência, mesmo em populações bem específicas, para os quais o diagnóstico foi realizado por metodologias muito distintas. Travassos e colaboradores (2012) avaliaram 63 gestantes soropositivas para HIV, no município de Salvador, por metodologia de captura híbrida (Qiagen) para *C. tracomatis* e cultura em meio de Thayer Martin para *N. gonorrhoeae*, descrevendo uma prevalência de 11,1% e 0% respectivamente. Adachi e colaboradores (2015) avaliaram 938 gestantes soropositivas para HIV, no Brasil, por metodologia Xpert CT/NG, em amostras de urina, descrevendo uma prevalência de 17,1% e 3,4%, para *C. tracomatis* e *N. gonorrhoeae*, respectivamente. Considerando os resultados observados nas diferentes metodologias realizadas no presente estudo, independente do pequeno número de pacientes no estudo de Travassos e colaboradores, fica claro que o estudo realizado por Adachi e colaboradores está muito mais próximo da real prevalência dessas ISTs em gestantes soropositivas.

Neste estudo, a infecção por *C. trachomatis* foi estatisticamente associada a gestantes com idade ≤ 24 anos ($p=0,038$) e estas possuíam 2,5 vezes mais chances de ter infecção por *C. trachomatis* do que as com idade > 25 anos (RC: 2,5; IC 95%: 1,080- 5,729; $p=0,032$). Dados semelhantes foram observados por Pinto e colaboradores (2011), que descreveram a associação da positividade para *C. trachomatis* com gestantes que apresentavam idade entre 15-19 anos. Jalil e colaboradores (2009) demonstraram que o principal fator de risco em gestantes para a infecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foi ter menos de 20 anos de idade. Por outro lado, Fernandes e colaboradores (2014) descreveram associação da obstrução tubária com a infecção por *C. trachomatis* e *N.*

gonorrhoeae em 2047 mulheres com histórico de infertilidade. Em recente estudo realizado no Para, a prevalência de infecções por *C. trachomatis* entre jovens universitárias foi de 11,9% (SANTOS et al., 2017).

Todos esses dados reforçam a importância e a necessidade de estratégias efetivas para detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em mulheres jovens assintomáticas.

Apesar dos altos níveis de IST entre gestantes assintomáticas no país, ainda há limitações para a implantação do rastreamento molecular de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* no SUS. Nesse contexto, os achados do presente estudo são particularmente relevantes, uma vez que essas ISTs, frequentemente assintomáticas, estavam presentes em mais que 50% das pacientes em trabalho de parto prematuro atendidas no hospital. Além disso, infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* são fatores de risco associados à ocorrência de aborto, gravidez ectópica, infertilidade (em ambos os sexos) e acometimento ocular em recém-nascidos, podendo levar a cegueira. Com o advento dos NAATs, a especificidade e a sensibilidade dos testes de CT e NG são muito mais altas e podem ser custo-efetivas para uso mesmo em países com recursos limitados (BRISTOW et al., 2015; JOSEPH DAVEY et al., 2016).

7 CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo são particularmente relevantes, primeiramente mostraram diferença significativa de sensibilidade e especificidade entre NAATs utilizados no sistema de saúde, destacando a importância do conhecimento das limitações de cada um para a escolha de um teste diagnóstico apropriado. Além disso, a utilização do teste Xpert CT/NG, permitiu associar o trabalho de parto prematuro com infecções por *C. trachomatis* (45,4% [45/99]) e *N. gonorrhoeae* (11,1% [11/99]) em aproximadamente 55% das gestantes de alto risco atendidas no HU/UFSC. Essas ISTs frequentemente assintomáticas, são consideradas fatores de risco associados a ocorrência de parto prematuro, aborto, gravidez ectópica, infertilidade (em ambos os sexos) e acometimento ocular em recém-nascidos, podendo levar a cegueira. Assim, o presente estudo corrobora a importância da implementação do rastreio para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em gestantes, utilizando um NAAT acurado, como uma medida decisiva para melhorar a saúde de mulheres e neonatos.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, K. et al. Chlamydia and Gonorrhoea in HIV-Infected Pregnant Women and Infant HIV Transmission. **Sexually Transmitted Diseases**, [s.l.], v. 42, no 10, p. 554–565, 2015.
- ALEXANDER, S. The challenges of detecting gonorrhoea and chlamydia in rectal and pharyngeal sites: could we, should we, be doing more?. **Sexually transmitted infections**, England, v. 85, no 3, p. 159-160, 2009.
- BACHMANN, L. H. et al. Nucleic acid amplification tests for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* rectal infections. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 48, no 5, p. 1827–1832, 2010.
- BACHMANN, L. H. et al. Advances in the Understanding and Treatment of Male Urethritis. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 61, no Suppl 8, p. S763–S769, 2015a.
- BACHMANN, L. H. et al. Advances in the Understanding and Treatment of Male Urethritis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, United States, v. 61 Suppl 8, p. S763-9, 2015b.
- BACHMANN, N.; POLKINGHORNE, A.; TIMMS, P. Chlamydia genomics: Providing novel insights into chlamydial biology. **Trends in Microbiology**, [s.l.], v. 22, no 8, p. 464–472, 2014.
- BAILEY, S. F. A Differential Medium for the Meningococcus and Gonococcus. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v. 34, no 6, p. 645–656, 1937.
- BALDIN-DAL POGETTO, M. R.; SILVA, M. G.; PARADA, C. M. G. D. L. Prevalência de doenças sexualmente transmissíveis em mulheres profissionais do sexo, em um município do interior paulista, Brasil. **Rev. Latino-Am. Enfermagem [Internet]**, [s.l.], v. 19, no 3, p. 7, 2011.
- BARBOSA, M. J. et al. Prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection in men attending STD clinics in Brazil Prevalência de *Neisseria gonorrhoeae* e infecção pela *Chlamydia trachomatis* em homens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 43, no 5, p. 500–503, 2010.
- BASHH. United Kingdom National Guideline for Gonorrhoea Testing 2012. [s.l.], p. 12, 2012.

BAUTISTA, C. T. et al. Bacterial vaginosis: a synthesis of the literature on etiology, prevalence, risk factors, and relationship with chlamydia and gonorrhea infections. **Military Medical Research**, [s.l.], v. 3, no 1, p. 4, 2016.

BENEDEK, T. G. Gonorrhea and the beginnings of clinical research ethics. **Perspectives in biology and medicine**, United States, v. 48, no 1, p. 54–73, 2005.

BENNETT, A. et al. Outbreak or illusion: consequences of “improved” diagnostics for gonorrhoea. **International journal of STD & AIDS**, England, v. 28, no 7, p. 667–671, 2017.

BENZAKEN, A. S. et al. Prevalência da Infecção por Clamídia e Gonococo em Mulheres Atendidas na Clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, [s.l.], v. 22, no 3, p. 129–134, 2010.

BEYDOUN, H. A. et al. Gender and Age Disparities in the Prevalence of Chlamydia Infection Among Sexually Active Adults in the United States. **Journal of Women’s Health**, 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, v. 19, no 12, p. 2183–2190, 2010.

BLACK, C. M. et al. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 40, no 10, p. 3757–3763, 2002.

BOSKEY, E. R. et al. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Human reproduction (Oxford, England)**, England, v. 16, no 9, p. 1809–1813, 2001.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis. [s.l.]: [s.n.], 2015. 89-108 p.

BRISTOW, C. C. et al. Laboratory evaluation of a dual rapid immunodiagnostic test for HIV and syphilis infection. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 53, no 1, p. 311–313, 2015.

BRISTOW, C. C. et al. Comparative Evaluation of 2 Nucleic Acid Amplification Tests for the Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* at Extragenital Sites. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 44, no 7, p. 398–400, 2017.

BROUWERS, M. et al. Specific and Sensitive Detection of *Neisseria gonorrhoeae* in Clinical Specimens by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 43, no 11, p. 5653–5659, 2005.

BRUNHAM, R. C. et al. The unexpected impact of a *Chlamydia trachomatis* infection control program on susceptibility to reinfection. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 192, no 10, p. 1836–1844, 2005.

BRUNHAM, R. C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. **Nature reviews. Immunology**, England, v. 5, no 2, p. 149–161, 2005.

CAO, B. et al. DNA microarray characterization of pathogens associated with sexually transmitted diseases. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 10, no 7, p. 1–13, 2015.

[CSL STYLE ERROR: reference with no printed form.]

CDC. Recommendations for the laboratory-based detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*--2014. **MMWR. Recommendations and reports**, [s.l.], v. 63, no RR-02, p. 1–19, 2014b.

CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance. **Sexually Transmitted Disease Surveillance 2014**, [s.l.], no November, p. 177, 2015.

CDC. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2016. **Center for Disease Control and Prevention**, [s.l.], p. 1–164, 2017.

CEPHEID. Xpert CT / NG Assay. [s.l.], no May, p. 4192, 2012.

CHERNESKY, M. et al. Head-to-head comparison of second-generation nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* on urine samples from female subjects and self-collected vaginal swabs. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 52, no 7, p. 2305–2310, 2014.

CHERNESKY, M. A. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie médicale / AMMI Canada**, [s.l.], v. 16, no 1, p. 39–44, 2005.

CHICO, R. M. et al. Prevalence of malaria and sexually transmitted and reproductive tract infections in pregnancy in sub-Saharan Africa: a systematic review. **JAMA**, United States, v. 307, no 19, p. 2079–2086, 2012.

CHONG, S. et al. Specimen processing and concentration of *Chlamydia trachomatis* added can influence false-negative rates in the LCx assay but not in

the APTIMA Combo 2 assay when testing for inhibitors. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 41, no 2, p. 778–782, 2003.

CHOROSZY-KROL, I. C.-K. et al. Characteristics of the *Chlamydia trachomatis* species - immunopathology and infections. **Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University**, Poland, v. 21, no 6, p. 799–808, 2012.

CODES, J. S. De et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na Cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [s.l.], v. 22, no 2, p. 325–334, 2006.

COHEN, M. S. et al. Human experimentation with *Neisseria gonorrhoeae*: rationale, methods, and implications for the biology of infection and vaccine development. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 169, no 3, p. 532–537, 1994.

COOK, R. L. et al. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Annals of internal medicine**, United States, v. 142, no 11, p. 914–925, 2005.

COSTA, M. C. et al. Sexually transmitted diseases during pregnancy: a synthesis of particularities. **Anais brasileiros de dermatologia**, Brazil, v. 85, no 6, p. 765–767, 2010.

DANBY, C. S. et al. Patterns of Extragenital Chlamydia and Gonorrhea in Women and Men Who Have Sex With Men Reporting a History of Receptive Anal Intercourse. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 43, no 2, p. 105–109, 2016.

DARVILLE, T. et al. Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, United States, v. 171, no 11, p. 6187–6197, 2003.

DARVILLE, T. Pelvic inflammatory disease: identifying research gaps--proceedings of a workshop sponsored by Department of Health and Human Services/National Institutes of Health/National Institute of Allergy and Infectious Diseases, November 3-4, 2011. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 40, no 10, p. 761–767, 2013.

DARVILLE, T.; HILTKE, T. J. Pathogenesis of genital tract disease due to *Chlamydia trachomatis*. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 201 Suppl, p. S114-25, 2010.

EDWARDS, J. L.; APICELLA, M. A. The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. **Clinical microbiology reviews**, United States, v. 17, no 4, p. 965–81, table of contents, 2004.

ELWELL, C.; MIRRASHIDI, K.; ENGEL, J. Chlamydia cell biology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 14, no 6, p. 385–400, 2016.

FARENCEA, A. et al. Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar trachoma. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 65, no 7, p. 2965 LP-2969, 1997.

FERNANDES, A. M. dos S. et al. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres atendidas em serviço de planejamento familiar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, [s.l.], v. 31, no 5, p. 1–6, 2009.

FIELD, N. et al. Confirmatory assays are essential when using molecular testing for *Neisseria gonorrhoeae* in low-prevalence settings: insights from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). **Sexually transmitted infections**, England, v. 91, no 5, p. 338–341, 2015.

FIELDS, K. A.; HACKSTADT, T. The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway. **Annual review of cell and developmental biology**, United States, v. 18, p. 221–245, 2002.

FORD, G. W.; DECKER, C. F. Pelvic inflammatory disease. **Disease-a-Month**, [s.l.], v. 62, no 8, p. 301–305, 2016.

GAUDET, R. G. et al. INNATE IMMUNITY. Cytosolic detection of the bacterial metabolite HBP activates TIFA-dependent innate immunity. **Science**, v. 348, n. 6240, p. 1251-5, 2015.

GAYDOS, C. A. et al. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 41, no 1, p. 304–309, 2003.

GAYDOS, Charlotte A et al. Comparison of three nucleic acids amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 42, no 7, p. 3041–3045, 2004.

GEIGER, R. et al. Validation of the GeneXpert(R) CT/NG Assay for use with Male Pharyngeal and Rectal Swabs. **Austin journal of HIV/AIDS research**, United States, v. 3, no 1, 2016.

GEISLER, W. M. et al. The natural history of untreated *Chlamydia trachomatis* infection in the interval between screening and returning for treatment. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 35, no 2, p. 119–123, 2008.

GEISLER, W. M. et al. Spontaneous resolution of genital *Chlamydia trachomatis* infection in women and protection from reinfection. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 207, no 12, p. 1850–1856, 2013.

GHYS, P. D. et al. The associations between cervicovaginal HIV shedding, sexually transmitted diseases and immunosuppression in female sex workers in Abidjan, Cote d'Ivoire. **AIDS (London, England)**, [s.l.], v. 11, no 12, p. F85–93, 1997.

GOIRE, N. et al. A duplex *Neisseria gonorrhoeae* real-time polymerase chain reaction assay targeting the gonococcal *porA* pseudogene and multicopy *opa* genes. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, United States, v. 61, no 1, p. 6–12, 2008.

GOIRE, N. et al. Molecular approaches to enhance surveillance of gonococcal antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, [s.l.], v. 12, no 3, p. 223–9, 2014.

GOLDENBERG, S. D. et al. Performance of the GeneXpert CT/NG assay compared to that of the Aptima AC2 assay for detection of rectal *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of residual Aptima Samples. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 50, no 12, p. 3867–3869, 2012.

GOLPARIAN, D. et al. Evaluation of the New BD Max GC Real-Time PCR Assay, Analytically and Clinically as a Supplementary Test for the BD ProbeTec GC Qx Amplified DNA Assay, for Molecular Detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 53, no 12, p. 3935–3937, 2015.

GONG, Z. et al. Lactobacilli inactivate *Chlamydia trachomatis* through lactic acid but not H₂O₂. **PLoS one**, United States, v. 9, no 9, p. e107758, 2014.

GRATRIX, J. et al. Evidence for increased Chlamydia case finding after the introduction of rectal screening among women attending 2 Canadian sexually transmitted infection clinics. **Clinical infectious diseases : an official**

publication of the Infectious Diseases Society of America, United States, v. 60, no 3, p. 398–404, 2015.

GRIFFAIS, R.; THIBON, M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. **Research in Microbiology**, [s.l.], v. 140, no 2, p. 139–141, 1989.

HACKSTADT, T. et al. Origins and functions of the chlamydial inclusion. **Trends in microbiology**, England, v. 5, no 7, p. 288–293, 1997.

HAGGERTY, C. L. et al. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 201 Suppl, p. S134-55, 2010.

HARRISON, O. B. et al. Genomic analysis of urogenital and rectal *Neisseria meningitidis* isolates reveals encapsulated hyperinvasive meningococci and coincident multidrug-resistant gonococci. **Sexually transmitted infections**, England, v. 93, no 6, p. 445–451, 2017.

HARVEY, H. A. et al. Gonococcal lipooligosaccharide is a ligand for the asialoglycoprotein receptor on human sperm. **Molecular microbiology**, England, v. 36, no 5, p. 1059–1070, 2000.

HASSANZADEH, P.; MARDANEH, J.; MOTAMEDIFAR, M. Conventional Agar-Based Culture Method, and Nucleic Acid Amplification Test (NAAT) of the *cppB* Gene for Detection of *Neisseria gonorrhoea* in Pregnant Women Endocervical Swab Specimens. **Iranian Red Crescent medical journal**, [s.l.], v. 15, no 3, p. 207–11, 2013.

HIGASHI, D. L. et al. Dynamics of *Neisseria gonorrhoeae* attachment: microcolony development, cortical plaque formation, and cytoprotection. **Infect Immun**, v. 75, n. 10, p. 4743-53, 2007.

HOEBE, C. J. P. a et al. Acceptability of self-taken vaginal swabs and first-catch urine samples for the diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* with an amplified DNA assay in young women attending a public health sexually transmitted disease clinic. **Sexually transmitted diseases**, [s.l.], v. 33, no 8, p. 491–495, 2006.

HOOK, E. W. 3rd. Gender differences in risk for sexually transmitted diseases. **The American journal of the medical sciences**, United States, v. 343, no 1, p. 10–11, 2012.

HOOK, E. W. 3rd; KIRKCALDY, R. D. A Brief History of Evolving Diagnostics and Therapy for Gonorrhoea: Lessons Learned. **Clinical infectious**

diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, United States, 2018.

HOSENFELD, C. B. et al. Repeat infection with Chlamydia and gonorrhea among females: a systematic review of the literature. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 36, no 8, p. 478–489, 2009.

ISON, C. A. et al. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: false negative gonococcal porA mutants are spreading internationally. **Sexually transmitted infections**, England, v. 89, no 3, p. 197–201, 2013.

JALIL, E. M. et al. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, [s.l.], v. 30, no 12, p. 1–6, 2008.

JAMES-HOLMQUEST, A. N. et al. Differential attachment by piliated and nonpiliated *Neisseria gonorrhoeae* to human sperm. **Infection and immunity**, United States, v. 9, no 5, p. 897–902, 1974.

JANSSEN, K. J. H. et al. Review of *Chlamydia trachomatis* viability methods: assessing the clinical diagnostic impact of NAAT positive results. **Expert review of molecular diagnostics**, England, 2018.

JORDAN, S. J. et al. Meatal Swabs Contain Less Cellular Material and Are Associated with a Decrease in Gram Stain Smear Quality Compared to Urethral Swabs in Men. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 55, no 7, p. 2249–2254, 2017.

JORGENSEN, J. et al. Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition. **Manual of Clinical Microbiology**. [s.l.]: [s.n.], 2015.

JOSEPH DAVEY, D. L. et al. Prevalence of Curable Sexually Transmitted Infections in Pregnant Women in Low- and Middle-Income Countries From 2010 to 2015: A Systematic Review. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 43, no 7, p. 450–458, 2016.

KAPARAKIS, M. et al. Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 3, p. 372–85, 2010.

KETTERER, M. R. et al. Desialylation of *Neisseria gonorrhoeae* Lipooligosaccharide by Cervicovaginal Microbiome Sialidases: The Potential for Enhancing Infectivity in Men. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 214, no 11, p. 1621–1628, 2016.

KONEMAN, E. W.; WINN, W. C. *Diagnostico Microbiologico: Texto E Atlas Colorido*. In: KOOGAN, G. (Org.). 6 ed. [s.l.]: [s.n.], 2008. 1608 p.

LANE, A. B.; DECKER, C. F. *Chlamydia trachomatis* infections. **Disease-a-Month**, [s.l.], v. 62, no 8, p. 269–273, 2016.

LEBER, A. L.; HALL, G. S.; LEBAR, W. D. Cumitech 44: Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. In: SHARP, S. E. (Org.). Washington: [s.n.], 2006. 51 p.

LEE, G.; SCHAFER, A. I. *Goldman-Cecil Medicina: Adaptado à realidade brasileira*. 25 ed. [s.l.]: Elsevier Editora Ltda., 2018. 3112 p.

LEFEVRE, M. L. Screening for Chlamydia and gonorrhea: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. **Annals of internal medicine**, United States, v. 161, no 12, p. 902–910, 2014.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. *Microbiologia Médica e Imunologia*. In: ARTMED (Org.). 7 ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2005.

LOW, N. et al. Global control of sexually transmitted infections. **Lancet (London, England)**, England, v. 368, no 9551, p. 2001–2016, 2006.

MA, B.; FORNEY, L. J.; RAVEL, J. The vaginal microbiome: rethinking health and diseases. **Annual review of microbiology**, [s.l.], v. 66, p. 371–389, 2012.

MAINA, A. N.; KIMANI, J.; ANZALA, O. Prevalence and risk factors of three curable sexually transmitted infections among women in Nairobi, Kenya. **BMC research notes**, [s.l.], v. 9, p. 193, 2016.

MANAVI, K. A review on infection with *Chlamydia trachomatis*. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [s.l.], v. 20, no 6, p. 941–951, 2006.

MARRAZZO, J. M.; MARTIN, D. H. Management of women with cervicitis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, United States, v. 44 Suppl 3, p. S102-10, 2007.

MARTIN, I. M. C. et al. Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 189, no 8, p. 1497–1505, 2004.

MARTIN, J. E. J. et al. Primary isolation of *N. gonorrhoeae* with a new commercial medium. **Public health reports (Washington, D.C. : 1896)**, United States, v. 82, no 4, p. 361–363, 1967.

MARTINS, T. A. et al. AS DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS SÃO PROBLEMAS ENTRE GESTANTES NO CEARÁ? **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, [s.l.], v. 16, no C, p. 50–58, 2004.

MAVROGIORGOS, N. et al. Activation of NOD receptors by *Neisseria gonorrhoeae* modulates the innate immune response. **Innate Immun**, v. 20, n. 4, p. 377-89, 2014.

MAYER, B. T. et al. Rapid and Profound Shifts in the Vaginal Microbiota Following Antibiotic Treatment for Bacterial Vaginosis. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 212, no 5, p. 793–802, 2015.

MCNALLY, L. P. et al. Low positive predictive value of a nucleic acid amplification test for nongenital *Neisseria gonorrhoeae* infection in homosexual men. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, United States, v. 47, no 2, p. e25-7, 2008.

MEDLINE, A.; DAVEVEY, D. J.; KLAUSNER, J. D. Lost opportunity to save newborn lives: variable national antenatal screening policies for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. **International journal of STD & AIDS**, [s.l.], v. 0, no October, p. 1–7, 2016.

MENON, S. et al. Human and Pathogen Factors Associated with *Chlamydia trachomatis*-Related Infertility in Women. **Clinical microbiology reviews**, United States, v. 28, no 4, p. 969–985, 2015.

MEYERS, D. S.; HALVORSON, H.; LUCKHAUPT, S. Screening for chlamydial infection: an evidence update for the U.S. Preventive Services Task Force. **Annals of internal medicine**, United States, v. 147, no 2, p. 135–142, 2007.

MOBIUS. Kit MULTIPLEX Plus para Detecção de Patógenos Causadores de Uretrite 9p. **Mobius Life Science**, 2016. Disponível em:<
<http://mobiuslife.com.br/dst-3/>>

MOLANO, M. et al. The natural course of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic Colombian women: a 5-year follow-up study. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 191, no 6, p. 907–916, 2005.

MORRISON, R. P.; FEILZER, K.; TUMAS, D. B. Gene knockout mice establish a primary protective role for major histocompatibility complex class II-restricted responses in *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. **Infection and immunity**, United States, v. 63, no 12, p. 4661–4668, 1995.

MORRISON, S. G. et al. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4(+) T cells but not CD8(+) T cells. **Infection and immunity**, United States, v. 68, no 12, p. 6979–6987, 2000.

MOZZATO-CHAMAY, N. et al. Polymorphisms in candidate genes and risk of scarring trachoma in a *Chlamydia trachomatis*--endemic population. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 182, no 5, p. 1545–1548, 2000.

NESS, R. B. et al. Chlamydia antibodies, chlamydia heat shock protein, and adverse sequelae after pelvic inflammatory disease: the PID Evaluation and Clinical Health (PEACH) Study. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 35, no 2, p. 129–135, 2008.

NWOKOLO, N. C. et al. 2015 UK national guideline for the management of infection with *Chlamydia trachomatis*. **International Journal of STD & AIDS**, [s.l.], v. 27, no 4, p. 251–267, 2016.

O'CALLAGHAN, I.; CORCORAN, D.; LUCEY, B. Design of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of clinical pathology**, [s.l.], v. 63, no 5, p. 431–3, 2010.

OAKESHOTT, P. et al. Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. **BMJ**, [s.l.], v. 340, 2010.

ORIEL, J. D. The Scars of Venus. In: SPRINGER-VERLAG (Org.). 1 ed. [s.l.]: [s.n.], 1994. 260 p.

OTA, K. V et al. Detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in pharyngeal and rectal specimens using the BD Probetec ET system, the Gen-Probe Aptima Combo 2 assay and culture. **Sexually transmitted infections**, England, v. 85, no 3, p. 182–186, 2009.

PALMER, H. M. et al. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 41, no 2, p. 835–837, 2003.

PATIL, M. J.; NAGAMOTI, J. M.; METGUD, S. C. Diagnosis of *Trichomonas Vaginalis* from Vaginal Specimens by Wet Mount Microscopy, In Pouch TV Culture System, and PCR. **Journal of global infectious diseases**, India, v. 4, no 1, p. 22–25, 2012.

- PENNA, G. O.; HAJJAR, L. A.; BRAZ, T. M. Gonorréia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 33, no 5, p. 451–464, 2000.
- PEARCE, W. A.; BUCHANAN, T. M. Attachment role of gonococcal pili. Optimum conditions and quantitation of adherence of isolated pili to human cells in vitro. **J Clin Invest**, v. 61, n. 4, p. 931-43, 1978.
- PIAZZETTA, R. C. P. S. et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea* infections in sexual actives young women at a Southern Brazilian city. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, [s.l.], v. 33, no 11, p. 328–333, 2011.
- PINTO, V. M. et al. *Chlamydia trachomatis* prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 38, no 10, p. 957–961, 2011.
- POL, Barbara VAN DER et al. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 39, no 3, p. 1008–1016, 2001.
- POL, B VAN DER et al. Multicenter evaluation of the AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for detection of *Chlamydia trachomatis*. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 38, no 3, p. 1105–1112, 2000.
- POPE, C. F. et al. Positive predictive value of the Becton Dickinson VIPER system and the ProbeTec GC Q x assay, in extracted mode, for detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually transmitted infections**, England, v. 86, no 6, p. 465–469, 2010.
- POSPISCHIL, A. From disease to etiology: historical aspects of Chlamydia-related diseases in animals and humans. **Drugs of today (Barcelona, Spain : 1998)**, Spain, v. 45 Suppl B, p. 141–146, 2009.
- QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nature Publishing Group**, [s.l.], v. 16, no 4, p. 226–240, 2018.
- QUINN, T. C. et al. Epidemiologic and microbiologic correlates of *Chlamydia trachomatis* infection in sexual partnerships. **JAMA**, United States, v. 276, no 21, p. 1737–1742, 1996.
- RIPA, T.; NILSSON, P. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. **Euro**

- surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, Sweden, v. 11, no 11, p. E061109.2, 2006.
- SAIKI, R. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, [s.l.], v. 239, no 4839, p. 487–491, 1988.
- SALOW, K. R. et al. Comparing mail-in self-collected specimens sent via United States Postal Service versus clinic-collected specimens for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in extra-genital sites. **PloS one**, United States, v. 12, no 12, p. e0189515, 2017.
- SANTOS, L.M. et al. Prevalência da infecção endocervical de *Chlamydia trachomatis* em universitárias do estado do Pará, Região Amazônica, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Brasil, v. 8, p. 27-33, 2017.
- SCHACHTER, J. et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of chlamydial and gonococcal infections of the oropharynx and rectum in men who have sex with men. **Sexually transmitted diseases**, United States, v. 35, no 7, p. 637–642, 2008.
- SETH-SMITH, H. M. B. et al. Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. **BMC genomics**, England, v. 10, p. 239, 2009.
- SILVA, D. DE et al. Whole-genome sequencing to determine transmission of *Neisseria gonorrhoeae*: an observational study. **The Lancet. Infectious diseases**, United States, v. 16, no 11, p. 1295–1303, 2016.
- SILVEIRA, M. F. et al. *Chlamydia trachomatis* infection during pregnancy and the risk of preterm birth: a case-control study. **International journal of STD & AIDS**, England, v. 20, no 7, p. 465–469, 2009.
- SINGLETON, T. E.; MASSARI, P.; WETZLER, L. M. Neisserial porin-induced dendritic cell activation is MyD88 and TLR2 dependent. **J Immunol**, v. 174, n. 6, p. 3545-50, 2005.
- SOOD, S. et al. Nucleic acid amplification tests (NAATs) for gonorrhoea diagnosis in women: Experience of a tertiary care hospital in north india. **Indian Journal of Medical Research**, [s.l.], v. 140, no November, p. 649–652, 2014.

STOTHARD, D. R. et al. Identification of a *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. **Infection and immunity**, United States, v. 66, no 12, p. 6010–6013, 1998.

SU, H. et al. The effect of doxycycline treatment on the development of protective immunity in a murine model of chlamydial genital infection. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 180, no 4, p. 1252–1258, 1999.

SUAY-GARCIA, B.; PEREZ-GRACIA, M. T. Future Prospects for *Neisseria gonorrhoeae* Treatment. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, Switzerland, v. 7, no 2, 2018.

TABRIZI, S. N. et al. Evaluation of opa-Based Real-Time PCR for Detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexually Transmitted Diseases**, [s.l.], v. 32, no 3, p. 199–202, 2005.

TABRIZI, S. N. et al. Evaluation of six commercial nucleic acid amplification tests for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 49, no 10, p. 3610–3615, 2011.

TABRIZI, S. N. et al. Analytical evaluation of GeneXpert CT/NG, the first genetic point-of-care assay for simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 51, no 6, p. 1945–1947, 2013.

TAPSALL, J. W. Antibiotic Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 41, no Supplement_4, p. S263–S268, 2005.

TAYLOR-ROBINSON, D. Genital infection by *Chlamydia trachomatis*: By J. D. ORIEL and G. L. RIDGWAY. 1982. Edward Arnold, London Pp. viii and 144. 13.50. **Journal of Medical Microbiology - J MED MICROBIOL**. [s.l.]: [s.n.], 1982. v. 15, 580-581 p.

TAYLOR, S. N. Epididymitis. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, United States, v. 61 Suppl 8, p. S770-3, 2015.

THAYER, J. D.; MARTIN, J. E. J. A SELECTIVE MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF *N. GONORRHOEAE* AND *N. MENINGITIDIS*. **Public health reports (Washington, D.C. : 1896)**, United States, v. 79, p. 49–57, 1964.

TORRONE, E. et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* genital infection among persons aged 14–39 years—United States, 2007–2012. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, [s.l.], v. 63, no 38, p. 834–8, 2014.

TRACY, C. R.; COSTABILE, R. A. The evaluation and treatment of acute epididymitis in a large university based population: are CDC guidelines being followed? **World journal of urology**, Germany, v. 27, no 2, p. 259–263, 2009.

TRAVASSOS, A. G. et al. Anogenital infection by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-infected men and women in Salvador, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, Brazil, v. 20, no 6, p. 569–575, 2016.

UNEMO, M. et al. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. **Microbiology (Reading, England)**, England, v. 156, no Pt 5, p. 1394–1404, 2010.

UNEMO, M. et al. The novel 2016 WHO *Neisseria gonorrhoeae* reference strains for global quality assurance of laboratory investigations: phenotypic, genetic and reference genome characterization. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, England, v. 71, no 11, p. 3096–3108, 2016.

UNEMO, M.; CLARKE, I. N. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*. **Current opinion in infectious diseases**, United States, v. 24, no 1, p. 62–69, 2011.

UNEMO, M.; RIO, C. DEL; SHAFER, W. M. Antimicrobial Resistance Expressed by *Neisseria gonorrhoeae*: A Major Global Public Health Problem in the 21st Century. **Microbiology spectrum**, United States, v. 4, no 3, 2016.

VAN-DER-POL, B. et al. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. **Journal of clinical microbiology**, United States, v. 39, no 3, p. 1008–1016, 2001

VERMA, R.; SOOD, S. Gonorrhoea diagnostics: An update. **Indian Journal of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 34, no 2, p. 139, 2016.

VIEIRA, M. L. V. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em mulheres assintomáticas de 18 a 30 anos utilizando a autocoleta como obtenção da amostra. 124 p. - Universidade Federal de Santa Catarina, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/167958/340466.pdf?sequence=1>>.

WALKER, J. et al. *Chlamydia trachomatis* incidence and re-infection among young women--behavioural and microbiological characteristics. **PloS one**, United States, v. 7, no 5, p. e37778, 2012.

WHILEY, D M et al. False-negative results using *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene PCR - a clinical gonococcal isolate with an *N. meningitidis* porA sequence, Australia, March 2011. **Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, Sweden, v. 16, no 21, 2011.

WHILEY, David M et al. Exploring “best practice” for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexual health**, Australia, v. 5, no 1, p. 17–23, 2008.

WHILEY, David M; TAPSALL, J. W.; SLOOTS, T. P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*: an ongoing challenge. **The Journal of molecular diagnostics : JMD**, United States, v. 8, no 1, p. 3–15, 2006.

WHILEY, D. M.; LAHRA, M. M. Review of 2005 Public Health Laboratory Network *Neisseria gonorrhoeae* nucleic acid amplification tests guidelines. **Communicable diseases intelligence quarterly report**, Australia, v. 39, no 1, p. E42-5, 2015.

WHO. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008. **Who**, [s.l.], p. 1–28, 2012.

WHO. Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. **World Health Organization**, [s.l.], p. 244, 2013a.

WHO. Report on global sexually transmitted infection surveillance 2015. [s.l.], p. 54p, 2015.

WHO. Validates elimination of mother-to-child transmission of HIV and syphilis in Cuba. **Saudi Medical Journal**, [s.l.], v. 36, p. 1018–1019, 2015.

WIESENFELD, H. Screening for *Chlamydia trachomatis* Infections in Women. **The New England journal of medicine**, United States, v. 376, p. 2198, 2017.

WOODS, C. R. Gonococcal infections in neonates and young children. **Seminars in pediatric infectious diseases**, United States, v. 16, no 4, p. 258–270, 2005.

WORKOWSKI, K. In the clinic. Chlamydia and gonorrhea. **Annals of internal medicine**, United States, v. 158, no 3, p. ITC2-1, 2013.

WORKOWSKI, K. A.; BERMAN, S. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports**, United States, v. 59, no RR-12, p. 1–110, 2010.

WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. **MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports**, United States, v. 64, no RR-03, p. 1–137, 2015.

XIONG, M. et al. Analysis of the sex ratio of reported gonorrhoea incidence in Shenzhen, China. **BMJ open**, England, v. 6, no 3, p. e009629, 2016.

ZIKLO, N. et al. *Chlamydia trachomatis* Genital Tract Infections: When Host Immune Response and the Microbiome Collide. **Trends in microbiology**, England, v. 24, no 9, p. 750–765, 2016.

ZHOU, X. et al. Hexa-acylated lipid A is required for host inflammatory response to *Neisseria gonorrhoeae* in experimental gonorrhea. **Infect Immun**, v. 82, n. 1, p. 184–92, 2014.