



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - CCS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE FARMÁCIA

Arthur da Paixão de Almeida

**PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE
*NEISSERIA GONORRHOEAE***

Florianópolis

2022

Arthur da Paixão de Almeida

**PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE
*NEISSERIA GONORRHOEAE***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a conclusão da Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II.

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

Coorientadora: Ma. Hanalydia de Melo Machado

Florianópolis

2022

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

Almeida, Arthur
PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA IDENTIFICAÇÃO DE
NEISSERIA GONORRHOEAE / Arthur Almeida ; orientadora,
Maria Luiza Bazzo, coorientadora, Hanalydia de Melo
Machado, 2022.
60 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. NEISSERIA GONORRHOEAE. 3. PCR EM TEMPO
REAL. 4. PADRONIZAÇÃO. I. Bazzo, Maria Luiza . II. de
Melo Machado, Hanalydia . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço meus pais, por todo o apoio durante esses 5 anos de pura loucura, pelos conselhos, puxadas de orelha e amor. E minhas irmãs que sempre estiveram do meu lado durante todo esse tempo, amo vocês.

Aos meus amigos Ricardo, Ana e Tainah que viraram parte da minha família durante esses anos... Agradeço por todos os momentos de felicidade, festas, carinhos e almoços no RU.

A todos meus colegas da graduação e pessoas que conheci ao longo dos últimos 5 anos, que me ajudaram e tornaram essa jornada mais engraçada e leve.

Agradeço meus amigos Sense8, Gabriel, Juarez, Carol, Laurielle, Luiza e Raphaela por terem entrado no meu ciclo de amizade no tempo certo, que nossa amizade dure longos e longos anos.

As minhas amigas mais antigas, Manoella e Natalia, obrigado por até aqui, sei que sempre posso contar com vocês.

E ao meu noivo, Davi Antunes, que entre todos os surtos e loucuras sempre apoia, em todos os momentos. Meu melhor amigo, companheiro e dono das minhas melhores risadas e sorrisos, te amo até o fim.

RESUMO

Introdução: *Neisseria gonorrhoeae*, é o agente etiológico da gonorreia, infecção que acomete as mucosas do trato urogenital, reto, orofaringe, conjuntiva e em alguns casos, pode evoluir para doença inflamatória pélvica e sepse. Isolados resistentes a todas as classes de antimicrobianos utilizados no tratamento da infecção gonocócica são consideradas uma ameaça à saúde pública. Dessa forma, para conter o avanço da transmissão de isolados resistentes, é necessário que os países realizem projetos de monitoramento e vigilância das isolados circulantes, a fim de adequar os esquemas terapêuticos nacionais. O presente estudo teve como objetivo otimizar uma etapa importante do estudo de vigilância realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, de forma a implantar de PCR em tempo real para a identificação *Neisseria gonorrhoeae*, substituindo a técnica que atualmente é executada no laboratório, tendo em vista que processos que minimizem o tempo de processamento, e aumentem a sensibilidade, são fundamentais para a melhoria da execução e aumento da capacidade de avaliação do projeto. O custo-benefício entre as duas técnicas também foi avaliado. **Materiais e métodos:** Treze pares de iniciadores foram avaliados *in silícico* pela especificidade e tamanho de produto amplificado, para posterior testagem *in vitro* utilizando cepas *Neisseria gonorrhoeae* presentes no laboratório. Foi selecionado e adaptado de Hjelmevoll e colaboradores (2006), um par de iniciadores para o alvo pseudogene *porA*. Em seguida foi realizada a padronização de PCR em tempo real utilizando o master mix PowerUp SYBR Green (Applied Biosystems, EUA). **Resultados:** Os iniciadores que geravam produto amplificado com tamanho inadequado para PCR em tempo real e com pouca especificidade foram descartados para utilização na padronização. O iniciador *porA*, sintetizado para a padronização da qPCR, foi testado na concentração de 0,4, 0,8, 1,2, e 1,6 μ L, sendo a concentração de 1,6 μ L escolhida para a padronização. A qPCR apresentou alta sensibilidade frente a todas os isolados de *Neisseria gonorrhoeae*, com eficiência de 94%, porém, são necessários mais testes frente a cepas de bactérias diferentes para verificar sua especificidade. **Discussão:** A PCR em tempo real é uma técnica que demanda menos trabalho que a PCR convencional, e além de apresentar maior sensibilidade, o processamento de múltiplas amostras é rápido, pois não depende de visualização em gel de agarose ao final. Além disso, o gene alvo é o ponto principal para a padronização do método, sendo necessário métodos que possibilitam averiguar sua especificidade. Na avaliação do custo-benefício, a PCR convencional além de necessitar de mais mão de obra na execução, apresentou um custo maior do que a PCR em tempo real no processamento de vinte amostras simultaneamente. **Conclusão:** A PCR em tempo

real apresentou resultados satisfatórios na identificação dos isolados. Porém, pela qPCR ser uma técnica mais rápida e sensível na identificação de patógenos, a sua padronização demanda etapas essenciais e cruciais anterior a sua utilização, necessitando de um amplo painel de cepas de referência de bactérias, diferentes de *Neisseria gonorrhoeae*, para serem testadas antes da sua implementação na rotina laboratorial do projeto de vigilância realizado no LBMMS.

Palavras-chave: *Neisseria gonorrhoeae*, PCR em tempo real. Padronização.

ABSTRACT

Introduction: *Neisseria gonorrhoeae*, is the etiologic agent of gonorrhea, an infection that affects the mucous membranes of the urogenital tract, rectum, oropharynx, conjunctiva and, in some cases, can progress to pelvic inflammatory disease and sepsis. Isolates resistant to all classes of antimicrobials used in the treatment of gonococcal infection are considered a threat to public health. Thus, to contain the advance of transmission of resistant isolates, it is necessary that countries carry out monitoring and surveillance projects of circulating isolates, in order to adapt national therapeutic schemes. The present study aimed to optimize an important stage of the surveillance study carried out by the Laboratory of Molecular Biology, Microbiology and Serology, in order to implement real-time PCR for the identification of *Neisseria gonorrhoeae*, replacing the technique that is currently performed in the laboratory, considering that processes that minimize processing time and increase sensitivity are fundamental for improving execution and increasing project evaluation capacity. The cost-benefit between the two techniques was also evaluated. **Materials and methods:** 13 pairs of primers were evaluated for the specificity and size of the amplified product, for further in vitro testing using *Neisseria gonorrhoeae* strains present in the laboratory. A primer pair for the *porA* pseudogene target was selected and adapted from Hjelmevoll et al. (2006). Then, real-time PCR standardization was performed using the PowerUp SYBR Green master mix (Applied Biosystems, USA). **Results:** Primers that contained inadequate amplified product size for real-time PCR and low specificity were discarded for use in standardization. The *porA* primer showed high sensitivity and specificity against all strains of *Neisseria gonorrhoeae* and there was no amplification of any other strain of other microorganisms tested. **Discussion:** Real-time PCR is a technique that requires less work than conventional PCR, and in addition to presenting greater sensitivity, the processing of multiple samples is fast, as it does not depend on agarose gel visualization at the end. In addition, the target gene is the main point for the standardization of the method, requiring methods that make it possible to verify its specificity. In the cost-benefit assessment, conventional PCR, in addition to requiring more labor in the execution, presented a higher cost than real-time PCR in the processing of 20 samples. **Conclusion:** Real-time PCR showed satisfactory results in the identification of isolates. However, as qPCR is a faster and more sensitive technique for identifying pathogens, its standardization requires essential and crucial steps prior to its use, requiring a broad panel of reference strains of bacteria, different from *Neisseria gonorrhoeae*, to be tested beforehand. of its implementation in the laboratory routine of the surveillance project carried out at LBMMS.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, real-time PCR. Standardization

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Fatores de virulência associados à membrana externa de NG..... | 17 |
| Figura 2 - Curva de dissociação dos iniciadores..... | 42 |
| Figura 3 - Curva de dissociação diluição DNA..... | 43 |
| Figura 4 - Curva de dissociação qPCR de validação..... | 44 |
| Figura 5 - Mapa de disposição dos isolados na qPCR de validação..... | 45 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na PCR simplex | 33 |
| Tabela 2 - Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na PCR multiplex..... | 33 |
| Tabela 3 - Ciclos e temperaturas PCR convencional..... | 33 |
| Tabela 4 - Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na qPCR..... | 34 |
| Tabela 5 - Ciclos e temperaturas qPCR..... | 35 |
| Tabela 6 - Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na qPCR..... | 35 |
| Tabela 7 - Protocolo utilizado na qPCR..... | 36 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 - Lista dos 13 iniciadores selecionados para os testes de especificidade <i>in silico</i> | 31 |
| Quadro 2 - Iniciadores para qPCR..... | 32 |
| Quadro 3 - Isolados bacterianos e quantificação de DNA extraído..... | 40 |
| Quadro 4 – Resultado dos 13 iniciadores selecionados para os testes de especificidade..... | 41 |
| Quando 5 -Preço por unidade dos insumos..... | 46 |
| Quadro 6 - Valor total Eletroforese..... | 46 |
| Quadro 7 - Preço por µl dos reagentes..... | 46 |
| Quadro 8 - Valor total para PCR convencional..... | 47 |
| Quadro 9 - Valor total para PCR convencional 20 amostras..... | 47 |
| Quadro 10. Valor total para qPCR de 3 amostras..... | 48 |
| Quadro 11. Valor total para qPCR 20 amostras..... | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMR do inglês Antimicrobial Resistance

CEACAM do inglês Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule

C(t) do inglês *Cycle Threshold*

DNA do inglês *desoxiribonucleic acid*

IST Infecção Sexualmente Transmissível

LBMMS laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia

LOS do inglês *lipooligosaccharide*

LPS lipopolissacarídeo

M Molar

mL Mililitro

mM Milimolar

NG *Neisseria gonorrhoeae*

Ng Nanograma

nM Nanomolar

OMS Organização Mundial de Saúde

PCDT Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas

NAATS do inglês *Nucleic Acid Amplification Tests*

nt Nucleotídeos

Pb Pares de base

PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*

qPCR do inglês *Real Time Polymerase Chain Reaction*

RNA do inglês *Ribonucleic Acid*

T4P do inglês *Type Four Pili*

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

μl Microlitro

WHO do inglês *World Health Organization*

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 <i>NEISSERIA GONORRHOEAE</i> | 16 |
| 2.2 PATOGÊNESE | 17 |
| 2.3 EPIDEMIOLOGIA..... | 18 |
| 2.4 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO..... | 19 |
| 2.4.1 Manifestações clínicas | 19 |
| 2.4.2 Métodos de diagnóstico | 20 |
| 2.4.2.1 Amplificação de ácidos nucleicos | 21 |
| 2.4.2.2 PCR em tempo real..... | 22 |
| 2.4.2.3 Kits comerciais | 23 |
| 2.5 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA | 24 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 26 |
| 4 OBJETIVO | 28 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL..... | 28 |
| 4.1.1 Objetivos específicos: | 28 |
| 5 METODOLOGIA | 29 |
| 5.1 AMOSTRAGEM..... | 29 |
| 5.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA | 29 |
| 5.3 SELEÇÃO DE INICIADORES | 30 |
| 5.3.1 Desenho de um iniciador | 31 |
| 5.4 PCR CONVENCIONAL PARA INICIADORES LBMMS | 32 |
| 5.5. PADRONIZAÇÃO qPCR | 34 |
| 5.5.1 Padronização da concentração dos iniciadores | 34 |
| 5.5.2 Padronização da concentração de DNA | 35 |

| | |
|---|-----|
| 5.5.3 qPCR de validação | 36 |
| 5.6 qPCR DE COLÔNIA | 36 |
| 5.7 CUSTO BENEFICIO | 37 |
| 6 RESULTADOS | 38 |
| 6.1 CULTURA E EXTRAÇÃO DE DNA | 38 |
| 6.2 SELEÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E PCR CONVENCIONAL | 40 |
| 6.3 PADRONIZAÇÃO qPCR | 42 |
| 6.4 qPCR DE COLÔNIA..... | 45 |
| 6.5 CUSTO BENEFÍCIO | 45 |
| 7 DISCUSSÃO | 49 |
| 8 CONCLUSÃO | 53 |
| REFERÊNCIAS | 54' |

1 INTRODUÇÃO

Neisseria gonorrhoeae (NG), ou gonococo, é um diplococo gram-negativo, e o agente etiológico da gonorreia, infecção sexualmente transmissível (IST) altamente contagiosa. A incidência global de gonorreia é estimada em 87 milhões de novos casos a cada ano, principalmente em países de baixa renda e populações carentes (RUSSELL; GRAY-OWEN; JERSE, 2020). Porém, atualmente as taxas de infecção em países desenvolvidos são altas, com aumento de 200% de casos notificados em 2017 em países como Reino Unido, França, Holanda e Espanha (UNEMO *et al.*, 2019). No Brasil, a estimativa do Ministério da Saúde é que ocorram mais de 500 mil novos casos de gonorreia por ano, principalmente na faixa etária entre 15 e 49 anos, dados provavelmente subestimados por não haver notificação compulsória no Brasil (BRASIL, 2015).

Devido à falta de vacina, o manejo da infecção causada por NG depende de diagnósticos acessíveis e antimicrobianos eficazes para o tratamento da gonorreia (QUILLIN; SEIFERT, 2018). NG possui grande capacidade de transferência de genes com outras bactérias e esta característica aumenta a probabilidade de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento da infecção gonocócica (QUILLIN; SEIFERT, 2018; UNEMO; SHAFER, 2014). A vigilância realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em isolados clínicos do gonococo tem identificado isolados resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis, destacando a possibilidade da transmissão de infecções gonocócicas intratáveis (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

Apesar de ser comumente associada com uretrite em homens e cervicite em mulheres, o gonococo é capaz de infectar qualquer mucosa do corpo humano, podendo causar infecções como conjuntivite, faringite e proctite, além de oftalmia neonatal gonocócica de transmissão durante o parto, uma das principais causas de cegueira adquirida em países em desenvolvimento (MCSHEFFREY, 2016). Mulheres são majoritariamente assintomáticas enquanto a sintomatologia clássica masculina apresenta disúria e secreção purulenta em 90% dos casos, contendo predominantemente neutrófilos e gonococos intracelulares, sendo as infecções assintomáticas em homens a minoria dos casos (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014; TRICHES; TRICHES; ROJAS, 2018). A falha no diagnóstico e falta de tratamento contribuem para a evolução da infecção do trato genital (TRICHES; TRICHES; ROJAS, 2018).

Os principais métodos de diagnóstico da gonorreia são a bacterioscopia, cultura e amplificação de ácidos nucleicos (NAATS). A identificação do gonococo em secreções

genitais, retais, faríngeas e oculares podem ser feitas pela coloração de Gram no esfregaço de secreção uretral ou cervical, porém, a cultura dos diplococos representa o método diagnóstico padrão, e os NAATS (Nucleic Acid Amplification Tests) apresentam sensibilidade superior para detecção NG (RYAN et al., 2007).

Desenvolvidos no século XX, os NAATS podem detectar sequências de DNA ou RNA de patógenos, sendo amplamente utilizadas nas mais diversas áreas de pesquisa e diagnóstico. Este método pode executar de uma a muitas amostras simultaneamente e fornecer resultados em menos de 90 minutos, além de ser altamente específico e sensível para a detecção de NG, podendo ser utilizado para identificação de gonococos viáveis e não viáveis em amostras genitais, urina, mucosa do reto e orofaringe (FIFER; ISON, 2014; WHILEY; TAPSALL; SLOOTS, 2006).

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) podem ser causadas por uma variedade de bactérias e outros microrganismos, e, além do impacto na saúde individual, acarreta diversos problemas na assistência à saúde quando tratadas ou diagnosticadas de forma incorreta. É de suma importância que projetos de monitoramento e vigilância de NG possuam ferramentas rápidas e confiáveis para identificação dos gonococos, obtendo informações e dados epidemiológicos acerca de resistência antimicrobiana em diferentes localidades, para atualização dos protocolos de tratamento e o manejo correto de antimicrobianos (COSTA-LOURENÇO *et al.*, 2017; JAMORALIN *et al.*, 2021).

Desde 2015, o Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) atua como centro coordenador do projeto nacional de vigilância da resistência de *Neisseria gonorrhoeae* aos antimicrobianos no Brasil. O projeto recebe e analisa amostras bacterianas isoladas a partir de amostras de secreção uretral masculina provenientes das cinco regiões geográficas do Brasil. Essas amostras são coletadas em 12 centros parceiros do projeto que realizam o processamento inicial até o isolamento de diplococos gram-negativos sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae*, os quais são congelados e encaminhados ao LBMMS para identificação de espécie, atualmente realizada por meio de PCR convencional e método automatizado VITEK2 (bioMérieux, France) e posterior análise de sensibilidade aos antimicrobianos por ágar diluição (BAZZO *et al.*, 2018)

Os resultados deste estudo têm como proposta otimizar etapas importantes dos estudos de vigilância dos isolados de NG, de forma a implantar processos que minimizem o tempo de

processamento, com aumento da sensibilidade são fundamentais para a melhoria e continuidade do projeto nacional de vigilância de NG.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *NEISSERIA GONORRHOEAE*

NG é um diplococo gram-negativo, imóvel, não formador de esporos, com capacidade de evadir e modular funções do sistema imunológico (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014; ORTIZ; SANTANDER; LUGO, 2021). Suas colônias são pequenas, de consistência lisa, aspecto brilhante, viscosas e bem aderidas ao meio, com margens definidas, que vão de 0,5 a 1 mm de diâmetro (BRASIL, 1997).

Com diâmetro entre 0,6 a 1,06 μ m, o gonococo é constituído por um envelope celular composto de três camadas: uma membrana citoplasmática interna, a parede celular é constituída de peptidoglicanas e uma membrana externa, contendo uma mistura complexa de proteínas, fosfolipídios e lipo-oligossacarídeos, dispostos como uma bicamada lipídica assimétrica (HUMBERT; CHRISTODOULIDES, 2020; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000).

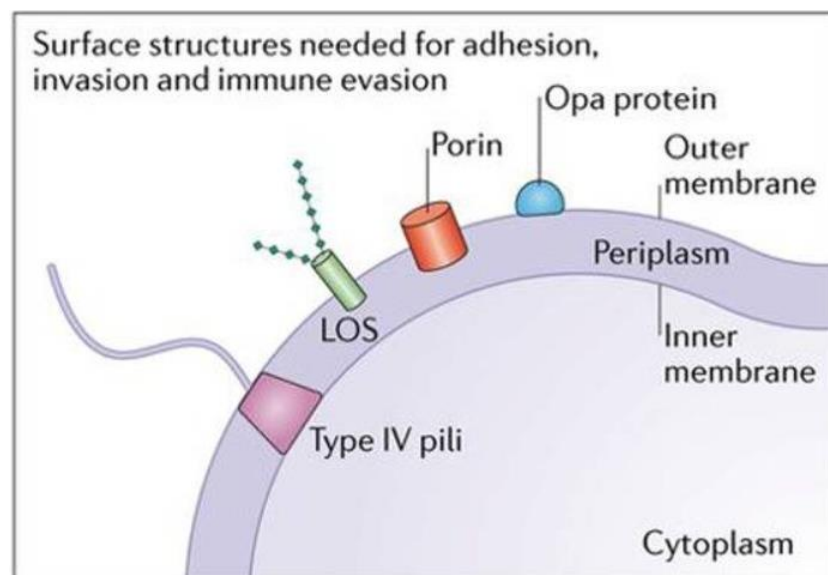
Pertencente ao grupo filogenético betaproteobacteria, e à família *Neisseriaceae*, este patógeno contempla o grupo do gênero *Neisseria*, ao qual pelo menos 23 espécies são relatadas, sendo metade dessas restritas à infecção humana, algumas causadoras de infecções restritas a animais e/ou correlacionadas. Em geral, as espécies do gênero *Neisseria* são bem adaptadas aos seus respectivos nichos, principalmente à mucosa humana (UNEMO et al., 2019).

Caracterizada por ser o agente etiológico da gonorreia, *Neisseria gonorrhoeae*, é o único patógeno verdadeiro do gênero *Neisseria*, o qual inclui *Neisseria meningitidis*, um patógeno oportunista e principal causador da meningite bacteriana, e outras espécies comensais que colonizam a nasofaringe humana ou eventualmente encontrada no trato urogenital inferior, tais como *N. lactamica*, *N. sicca*, *N. sineria*, *N. flavescens*, *N. subflava* e *N. mucosa* (BERNARDINI et al., 2004; QUILLIN; SEIFERT, 2018).

2.2 PATOGÊNESE

O gonococo possui componentes específicos de superfície que lhe conferem propriedades de aderência à mucosa, penetração tecidual e celular, citotoxicidade e evasão das defesas dos hospedeiros. Essas estruturas de superfície incluem *pili* tipo IV, proteínas lipooligossacarídeo (LOS), porinas e proteínas de opacidade (Opa). O lipopolissacarídeo (LPS) do gonococo carece do componente polissacarídeo O em repetição, que é típico do LPS clássico, sendo assim, é referido como lipooligossacarídeo (LOS). O lipídio A da estrutura do LOS é a porção ativa por meio de sua capacidade de regular positivamente a resposta inflamatória. Mudanças na configuração ou na estrutura conformacional do lipídeo A afetam a resposta biológica, tendo influência na sinalização imune inata, susceptibilidade a medicamentos e patogênese (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014).

Figura 1. Fatores de virulência associados à membrana externa de NG.



Fonte: QUILIN e SEIFERT, 2019. Legenda: Type IV pili: *pili* tipo IV; LOS: lipooligossacarídeo; Porin: porina; Opa protein: proteína OPA; Outer membrane: membrana externa; Periplasm: periplasma; Inner membrane: membrana interna; Cytoplasm: citoplasma.

Esta espécie adere nas superfícies de células epiteliais do hospedeiro por meio de uma estrutura chamada *pili*, que são projeções de polímeros proteicos na superfície da célula bacteriana. Além da aderência, a presença de *pili* confere às células bacterianas uma maior resistência à fagocitose e destruição dos gonococos por neutrófilos, e está relacionada com a troca de material genético (BRASIL, 1997; MARIA; COSTA, 2013; PLANT et al., 2006). Os

pili tipo IV (T4P) são cruciais para mediar a aderência celular inicial. Os T4P possuem uma força mecânica considerável, permitindo que haja uma retração estreita entre a superfície celular com as bactérias que possuem estes filamentos (KOLAPPAN et al., 2016).

As proteínas Opa são abundantes na membrana externa do gonococo e medeiam a aderência após o contato inicial por *pili* tipo IV. Os *pili* do tipo IV e as proteínas Opa são expressas durante a infecção tanto de mulheres quanto de homens, e são consideradas essenciais para a colonização do epitélio da mucosa do trato genital e outros locais de infecção. A maioria das proteínas Opa se ligam a uma ou mais moléculas de adesão celular relacionadas ao antígeno carcinoembrionário humano (CEACAMs), uma família de proteínas expostas à superfície de mucosas incluindo a da vagina, ectocérvice, endocérvice, útero e reto, favorecendo a fixação do gonococo nesses tecidos. A interação entre proteínas Opa da bactéria com receptores CEACAM ativa o processo de transcitose da bactéria através das células epiteliais, atingindo a lâmina própria e o espaço intraepitelial, dando início ao processo de interiorização das bactérias às células do hospedeiro (MCSHEFFREY, 2016; UNEMO et al., 2019). As porinas expressas por NG atuam como canais de passagens de pequenas moléculas para o periplasma (DELCOUR, 2010). A porina de NG (*PorB*) é uma das proteínas mais abundantes na membrana externa e permite a troca de íons entre a bactéria e o ambiente onde ela se encontra (QUILLIN; SEIFERT, 2018). As moléculas do LOS sofrem sialilação através de sialiltransferases presentes no tecido infectado, promovendo inibição da atividade das vias clássica e alternativa do sistema do complemento (SHAUGHNESSY; RAM; RICE, 2019).

Os LOS podem influenciar na aderência, ligação bacteriana, invasão celular e na resistência à ação dos anticorpos do soro humano, pois interagem com as células humanas resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, incluindo interleucina 1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), os quais são importantes no estabelecimento da patogênese da infecção (PLANT et al., 2006). A liberação de citocinas e quimiocinas por vias de sinalização do sistema imune, recruta um grande número de leucócitos polimorfonucleares, para o local da infecção, no qual interagem e fagocitam NG. O influxo de leucócitos forma um exsudato purulento que facilita a transmissão do gonococo (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

A gonorreia é a segunda infecção sexual bacteriana de maior prevalência, ficando atrás apenas das infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* (GUEDES, 2021). Entre 2005 e

2008, o número mundial de casos reportados de infecções gonocócicas aumentou em 21% em adultos entre 15 e 49 anos (SILVA; GOMES; SILVA, 2020). A distribuição global de casos de gonorreia é explicada por meio de fatores socioeconômicos, demográficos, práticas sexuais, políticas no fornecimento de informações acerca de ISTs, testes e diagnósticos, o que afeta desproporcionalmente populações marginalizadas e vulneráveis (UNEMO et al., 2019). Em 2016 a Organização Mundial da Saúde estimou 86,9 milhões de casos de gonorreia no mundo, majoritariamente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, principalmente entre adultos de 15 a 49 anos de idade (COSTA-LOURENÇO et al., 2017).

Embora a maior taxa de incidência de gonorreia ocorra nos países não desenvolvidos e em desenvolvimento, as taxas de infecção em países desenvolvidos são altas. O número de casos notificados aumentou em 200% desde 2008 em países europeus, de 29.434 casos em 2008 para 89.239 casos em 2017, sendo os principais países o Reino Unido, França, Holanda e Espanha (UNEMO et al., 2019). Em 2009, o centro Europeu de prevenção e Controle de Doenças (ECDC) reportou 29.202 casos de gonorreia, com uma taxa de 9,7 casos por 100.000 habitantes, sendo que em homens (15,9/100.000 habitantes), a gonorreia foi reportada três vezes mais que em mulheres (6,3/100.000) (MARIA; COSTA, 2013).

No Brasil, a estimativa do Ministério da Saúde do Brasil, é que ocorram mais de 500 mil novos casos de gonorreia por ano, principalmente na faixa etária entre 15 e 49 anos. Esses dados podem estar subestimados, visto que, a escassez de informações acerca da epidemiologia das infecções causadas por NG no Brasil, reflete o fato de que a gonorreia não está presente na lista nacional de doenças e agravos de notificação compulsória, de forma que as informações disponíveis têm base em estudos com grupos restritos, não retratando o real cenário do território brasileiro (BRASIL., 2016; TRICHES; ROJAS, 2018).

2.4 SINTOMATOLOGIA E DIAGNÓSTICO

2.4.1 Manifestações clínicas

A gonorreia é uma doença infecciosa do trato urogenital, transmitida quase que exclusivamente por contato sexual ou perinatal (PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000).

É relatada desde os tempos antigos, referida em textos bíblicos, chineses e gregos. Galeno, um médico de origem grega, no século II d. C., usava a palavra “gonorrehea”, que

significa “fluxo de sementes”, para descrever o exsudato purulento de homens, confundido com o sêmen humano (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014).

O agente etiológico da gonorreia foi descrito pela primeira vez por Albert Neisser em 1879, por meio da técnica de esfregaço e coloração com violeta de metila (LIGON, 2005) e posteriormente, em 1882, Leistikow e Löffler cultivaram o gonococo, denominando-o *Neisseria gonorrhoeae* (PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000). Apesar de ser comumente associado com uretrite em homens e cervicite em mulheres, o gonococo é capaz de infectar qualquer mucosa do corpo humano, podendo causar infecções como conjuntivite, faringite, proctite, e oftalmia neonatal gonocócica adquirida durante o parto vaginal, considerada uma das principais causas de cegueira adquirida em países em desenvolvimento (MCSHEFFREY, 2016).

O período de incubação varia de 2 a 5 dias após o contato sexual com o parceiro portador do gonococo. A sintomatologia clássica masculina consiste em disúria e secreção purulenta em 90% dos casos, contendo predominantemente neutrófilos e gonococos intracelulares, sendo as infecções assintomáticas em homens a minoria dos casos (MCSHEFFREY; GRAY-OWEN, 2014; TRICHES; TRICHES; ROJAS, 2018). Em mulheres, as infecções são majoritariamente assintomáticas, visto que a secreção purulenta endocervical é frequentemente interpretada como corrimento vaginal inespecífico. Quando presentes, as manifestações mais comuns são cervicite com secreção vaginal, sangramento, prurido e disúria (MAYOR; ROETT; UDUHIRI, 2012; TRICHES; TRICHES; ROJAS, 2018). A falha no diagnóstico e falta de tratamento contribuem para a evolução da infecção do trato genital, que pode desencadear quadros de maior severidade como: doença inflamatória pélvica, infertilidade, gravidez ectópica e aborto (TRICHES; TRICHES; ROJAS, 2018).

2.4.2 Métodos de diagnóstico

O diagnóstico laboratorial para infecções não complicadas causadas por *Neisseria gonorrhoeae* é estabelecido pela identificação do gonococo por isolamento em cultura e/ou biologia molecular. A técnica de Gram permite a identificação presuntiva e detecta diplococos gram-negativos intracelulares em esfregaços de secreções genitais, retais, faríngeas e oculares, no entanto, possui baixa sensibilidade em amostras de homens e mulheres assintomáticos, faringe e reto, devido a presença de *Neisserias* comensais nestes nichos e, portanto, deve ser utilizada com cautela nestes casos (UNEMO; SHAFER, 2014).

Apesar do gonococo ser um patógeno muito exigente e fastidioso, a cultura de NG é sensível e altamente específica para a identificação dos diplococos, principalmente em amostras

urogenitais, onde a sensibilidade pode chegar a 85–95% para infecção aguda e cerca de 50% para casos assintomáticos, além de ser o único método estabelecido que permite realizar o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (AMR) completo (MEYER; BUDER, 2020). Para identificação presuntiva das espécies de *Neisseria* sp, testes bioquímicos podem ser utilizados, entre eles catalase (+), oxidase (+), e de açúcares em ágar cistina tripticase (CTA) (glicose +) (SERRA-PLADEVALL et al., 2017). Por ser um microrganismo fastidioso, NG requer um ambiente rico em CO₂ e meio de crescimento especializado em ágar para ser cultivado em laboratório. A sensibilidade da detecção por cultura pode, portanto, ser afetada por variações na qualidade da amostra coletada, do meio de isolamento e das condições de transporte e incubação (RYAN et al., 2007).

2.4.2.1 Amplificação de ácidos nucleicos

Em meados do século XX, uma série de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) foram desenvolvidas, os quais podem detectar sequências de DNA ou de RNA de patógenos. As NAATS apresentam maior especificidade e sensibilidade para a detecção de NG, podendo ser utilizado para identificação de gonococos viáveis e não viáveis em amostras genitais, urina, mucosa do reto e orofaringe (WHILEY; TAPSALL; SLOOTS, 2006). Essas metodologias podem executar de uma a muitas amostras e fornecer resultados em menos de 90 minutos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional, a qPCR (PCR em tempo real) e a TMA (Amplificação mediada por transcrição) são alguns exemplos de NAATs (FIFER; ISON, 2014; HOLOGIC, 2019).

Desenvolvida no final da década de 1980, a técnica de PCR revolucionou a biologia molecular. Com capacidade de amplificar uma única sequência de ácidos nucleicos em um número exponencial de cópias, é hoje amplamente utilizada nas mais diversas áreas de pesquisa e diagnóstico. A PCR é um sistema que permite a amplificação do DNA ou RNA *in vitro*, com alta especificidade e sensibilidade, sendo necessária uma padronização do método para cada tipo de amostra utilizada (BHANO THU; VENKATESAN, 2019).

Para que uma reação de PCR ocorra, são necessários alguns componentes básicos como: um DNA com uma sequência alvo, um par de iniciadores (oligonucleotídeos iniciadores) que são complementares a um fragmento de DNA molde, desenhados para reconhecer a região de interesse; desoxirribonucleotídeos (dNTPs), nucleotídeos (ATP, TTP, CTP, GTP) necessários para a síntese do DNA; uma enzima termoestável TaqDNA polimerase, que age como

catalisadora da extensão dos iniciadores e $MgCl_2$, que atua como cofator da enzima polimerase (DANIEL; VIEIRA, 2018).

O sistema de PCR utiliza de ciclos térmicos de duas ou três temperaturas diferentes, sendo essas cruciais para a amplificação do produto. O princípio da técnica é simples, consistindo em 3 etapas indispensáveis: a) inicialmente é necessário que a dupla fita de DNA - que servirá de molde - seja aberta, em temperatura variando 94 a 95°C realiza a separação das fitas simples, esta etapa é chamada de desnaturação; b) A etapa do pareamento ocorre entre as temperaturas de 55-65°C e utiliza oligonucleotídeos iniciadores (primers), os quais se emparelham nas sequências de nucleotídeos complementares das fitas de DNA genômico já dissociadas - a ligação dos iniciadores à fita complementar dá a especificidade para amplificação, e c) Após a área ser delimitada pelos iniciadores, a enzima Taq DNA Polimerase age a 72°C fazendo a extensão da fita, utilizando cada um dos quatro dNTPs como substrato da reação de polimerização, sempre na direção 5'-3'. Os fragmentos de DNA recém-formados fornecem mais moldes para a montagem de mais fitas, em ciclos subsequentes (BHANOTHU; VENKATESAN, 2019). Todo o processo ocorre por ciclagem térmica, para o qual utiliza-se um termociclador; no método convencional da PCR, a visualização DNA amplificado (amplicons) é realizada gel de agarose ou poliacrilamida corados com brometo de etídio, posteriormente visualizados em transiluminador com luz ultra-violeta (UV) (DANIEL; VIEIRA, 2018).

2.4.2.2 PCR em tempo real

Ao contrário da PCR convencional, cujo os amplicons só podem ser visualizados ao final de todo o processo, a qPCR permite monitoração do produto amplificado à medida em que a PCR progride. É um método sensível e que apresenta grande especificidade, podendo ser utilizado como método de detecção, identificação, quantificação e genotipagem de genes e microrganismos (HARSHITHA, 2021).

O método combina a PCR e a detecção de fluorescência, e pode ser utilizado por metodologias diferentes, entre elas, o sistema de sondas de hidrólise, que utiliza uma molécula repórter fluorescente (fluoróforo) na posição 5' de uma sonda (oligonucleotídeo) e na outra extremidade um "quencher" (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade de exonuclease 5' - 3' da Taq DNA polimerase, e apesar de ser altamente sensível, é um método mais caro e complexo, pois necessita o desenho de uma sonda específica

(GUEST, 2017; NOVAIS et al., 2014). Já o sistema com agentes intercalantes de DNA, O SYBR Green, um dos produtos mais utilizados, utiliza o corante SYBR Green I, o qual intercala cada nova cópia de DNA dupla-fita amplificado durante a extensão da cadeia pela DNA polimerase, gerando fluorescência à medida que a amplificação prossegue. Conforme a PCR progride, são formados mais amplicons, e como o corante SYBR Green I se liga a qualquer DNA dupla-fita, o aumento na intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de produto gerado durante o processo. SYBR Green é um dos produtos químicos mais utilizados, pois, além de ser de fácil uso, é comparativamente mais barato que a utilização de sondas de hidrólise (HARSHITHA, 2021).

O desempenho de uma reação de qPCR é diretamente influenciado pelo desenho e concentração dos iniciadores, concentrações dos diferentes reagentes, o número de ciclos, e as temperaturas de desnaturação e pareamento. Para garantir que a técnica de qPCR alcance níveis elevados de especificidade e sensibilidade, é necessário a padronização de protocolo, a fim de evitar aparecimento de produtos inespecíficos, contaminações, impurezas ou baixa eficiência na amplificação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2007).

2.4.2.3 Kits comerciais

O genoma de NG apresenta aproximadamente 2 milhões de pares de bases, e graças ao avanço do mapeamento genômico desta bactéria, diferentes sequências de genes podem ser utilizadas para sua detecção, entre elas: *16S rRNA*, pseudogene *porA*, *cppB* (plasmídeo críptico), *opA*, *orf1* e DNA da citosina de metiltransferase. Entre os mencionados, o gene *16s rRNA*, e o pseudogene *porA*, são relatados na literatura como extremamente conservados, exibindo quase 100% de especificidade para NG, sendo amplamente utilizados em ensaios de triagem (MCSHEFFREY, 2016; SHIPITSYNA, 2018; VERMA et al., 2010).

Devido maior sensibilidade que a cultura, os NAATs para detecção de NG tornaram-se o método de escolha para a testagem tanto de infecções assintomáticas, quanto para sintomáticas. A capacidade de utilizar amostras não invasivas como urina, facilita a triagem de IST's, além de permitir detecção de NG não viáveis, possibilitando os diagnósticos em amostras que o protocolo e transporte de amostra não garantem a viabilidade (FIFER; ISON, 2014).

Diferentes kits comerciais baseados em NAAT permitem a detecção de *NG* e *Chlamydia trachomatis* simultaneamente na mesma amostra, utilizando diferentes métodos de amplificação de ácidos nucléicos (TIAN et al., 2020). Entre os testes comerciais de NAAT aprovados pela federação regulatória da *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados

Unidos da América (EUA) para a detecção simultânea de NG e *C. trachomatis* em espécimes urogenitais estão: Abbott RealTime m2000 CT/NG (Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL, EUA) e o teste Amplicor e Cobas CT/NG (Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, NJ, EUA) que realiza detecção direta do DNA genômico por meio de qPCR de NG em amostras de swab endocervical ou vaginais femininos, amostras de esfregaços uretrais masculinos ou em amostras de urina masculinas e femininas (LUIJT et al., 2005). O teste APTIMA (HOLOGIC®, San Diego, CA, EUA) utiliza a tecnologia TMA, na qual moléculas alvo de rRNA de *C. trachomatis* e de NG são isoladas de regiões específicas e amplificadas utilizando o isolamento específico do RNA alvo presente na amostra, pelo uso de micropartículas magnéticas ligadas a oligômeros de captura complementares a sequências de regiões do RNA alvo (HOLOGIC, 2019; VENTER et al., 2019). O Xpert® CT/NG Assay (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA) realiza a detecção dos ácidos nucleicos por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real e rápida, em um dispositivo que incorpora também a etapa de extração do ácido nucleico (TIAN et al., 2020; UNEMO et al., 2019).

No Brasil, segundo o site da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os NAATS aprovados para detecção de NG e *C. trachomatis* simultaneamente são: teste Amplicor e Cobas CT/NG (Roche Molecular Diagnostics, Branchburg, NJ, EUA), Abbott RealTime m2000 CT/NG (Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL, EUA), Xpert® CT/NG Assay (Cepheid, Sunnyvale, CA, EUA), teste APTIMA (HOLOGIC®, San Diego, CA, EUA) (ANVISA, 2022).

2.5 TRATAMENTO E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Na ausência de uma vacina, o manejo e controle da infecção causada por NG dependem de medidas eficazes de prevenção, vigilância epidemiológica, diagnóstico precoce e tratamento adequado. Porém, os diversos mecanismos moleculares de resistência aos antimicrobianos adquiridos ou desenvolvidos pelo gonococo colocam a eficácia do regime de tratamento de NG em discussão (QUILLIN; SEIFERT, 2018; UNEMO *et al.*, 2019).

NG possui capacidade natural de transferência de genes completos ou parciais. O gonococo possui competência de captar DNA gonocócico, ou, em menor grau, DNA de outras bactérias do ambiente onde se encontra e recombiná-lo facilmente em sequências homólogas em seu genoma. Esta alta transferência de genes de NG com outras bactérias, aumenta a probabilidade de que os genes do gonococo - que codificam determinantes de resistência a antimicrobianos - sofram mutações e desenvolvam perfil de resistência (QUILLIN; SEIFERT, 2018).

A vigilância de NG realizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou isolados resistentes à maioria dos antimicrobianos disponíveis, caracterizando-os como potencialmente intratáveis (WHO, 2016). Além de desenvolver resistência a todos os antimicrobianos já recomendados para o tratamento de gonorreia – como sulfonamidas, penicilinas, tetraciclínas e macrolídeos - atualmente são relatados isolados resistentes às cefalosporinas de espectro estendido como cefixima e ceftriaxona, que hoje integram a relação de antimicrobianos de primeira linha no tratamento de gonorreia (QUILLIN; SEIFERT, 2018; UNEMO *et al.*, 2019).

No Brasil, a recomendação para o tratamento de infecções gonocócicas não complicadas é a administração de dose única de ceftriaxona 500mg intramuscular (IM) em combinação com 1g de azitromicina via oral (VO). Os estudos de vigilância de resistência antimicrobiana permitem adaptação dos protocolos de tratamento, a terapia de escolha pode sofrer alteração de acordo com o perfil de sensibilidade apresentado pelas cepas, que podem ser distintas em cada região (PCDT, 2020). Nos países que não realizam a vigilância de resistência aos antimicrobianos, a OMS recomenda a terapia combinada de ceftriaxona 250mg IM dose única, mais azitromicina 1g oral dose única (WHO, 2016).

3 JUSTIFICATIVA

A gonorreia é uma doença global que afeta milhões de pessoas anualmente. O rápido aumento nos últimos anos de isolados de NG resistentes aos antimicrobianos que fazem parte do protocolo de tratamento é um cenário preocupante para a saúde pública. Já é conhecida a existência de linhagens de NG resistentes a todos antimicrobianos utilizados no regime terapêutico, para infecções não complicadas, em diferentes países. Tendo em vista a grande área territorial do Brasil e a gonorreia não pertencer à lista nacional de doenças e agravos de notificação compulsória, se faz necessário projetos de monitoramento e vigilância de resistência em NG, com capacidade de abranger diferentes estados, de forma que os dados de infecções e resistência aos antimicrobianos não sejam subestimados, refletindo a realidade do cenário epidemiológico brasileiro.

As ferramentas comerciais de identificação de NG por NAATS são fundamentais para o diagnóstico rápido e preciso da gonorreia, ao passo que protocolos simplificados e de baixo custo são ideais para identificação da espécie de NG em laboratórios de pesquisa, tendo em vista o caráter epidemiológico e de vigilância desses locais.

O laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) atua como centro coordenador do projeto nacional de vigilância da resistência aos antimicrobianos em NG no Brasil. As amostras do projeto são coletadas nos 12 centros parceiros que realizam o processamento inicial até o isolamento de diplococos gram-negativos sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae*, os quais são congelados e encaminhados ao LBMMS para identificação de espécie (BAZZO et al., 2018). Esses isolados ao chegarem no laboratório são processados para identificação e posterior análise de sensibilidade aos antimicrobianos por ágar diluição, além das provas bioquímicas presuntivas catalase e oxidase, que são positivas para NG.

O LBMMS recebeu mais de 800 isolados bacterianos na última edição do projeto (2018-2020). Dessa forma, a implantação de processos que minimizem o tempo de processamento, com aumento de sensibilidade e redução de custos é fundamental para a melhoria da execução e aumento da capacidade de avaliação do projeto.

Atualmente, a identificação da bactéria é realizada por VITEK2 (bioMérieux, France) e PCR convencional, e embora a PCR convencional seja sensível para isolados clínicos, é laboriosa para grandes quantidades de amostras, uma vez que a interpretação da reação depende da etapa de visualização do produto de PCR em gel de agarose. A transição da PCR

convencional para a qPCR irá agilizar a etapa da identificação e aumentar a capacidade de testagem.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar uma PCR em tempo real para identificação de *Neisseria gonorrhoeae* a partir de colônias isoladas de amostras clínicas.

4.1.1 Objetivos específicos:

- Analisar custo/benefício da PCR convencional versus PCR em tempo real;
- Avaliar possibilidade de realização da qPCR diretamente de colônia bacteriana, sem passar pelo processo de extração do DNA da bactéria.

5 METODOLOGIA

5.1 AMOSTRAGEM

Os isolados utilizados nos experimentos compõem o banco de bactérias do LBMMS e estavam armazenados em criotubos contendo caldo Casoy+20% de glicerol à -80°C.

Os isolados utilizadas nos experimentos são 11 cepas de referência da Organização Mundial da Saúde (WHO F, WHO G, WHO V, WHO X, WHO K, WHO O, WHO P, WHO L, WHO M, WHO N e WHO Y) 1 cepa ATCC (ATCC 49226®) de NG, 24 isolados de NG que pertencem ao projeto de vigilância de antimicrobianos, utilizados para aumentar a diversidade de isolados, além de *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Neisseria sicca* e *Neisseria elongata*.

Esses isolados foram reativados em Ágar chocolate; as culturas foram incubadas por 18-24h a 35 +/-1°C em atmosfera úmida e enriquecida com 5% de CO₂.

5.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Para os experimentos foi realizada extração do DNA das colônias pelo método de fervura, utilizando-se microtubos de 1,5mL contendo suspensões bacterianas de aproximadamente 2,0 McFarland, em 1mL de PBS 1X (pH 7,3). As suspensões foram centrifugadas a 2000 g por 5 minutos e tiveram seu sobrenadante retirado. Em seguida, foi adicionado 1mL de PBS e a mistura homogeneizada em vórtex. Os microtubos foram incubados a 100°C por 10 minutos e posteriormente centrifugados em velocidade máxima por 1 minuto. Ao final, 200µl do sobrenadante foram aliqotados em um novo tubo de 1,5mL e posteriormente armazenados a -20°C.

Após a extração, foi realizada a quantificação do DNA bacteriano utilizando o espectrofotômetro NanoVue Plus (General Eletrics, EUA), conforme instruções do fabricante.

5.3 SELEÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Anterior a identificação de NG por qPCR, foi realizada a etapa de busca na literatura acerca dos genes mais conservados da bactéria, a fim de evitar pareamentos secundários com outras espécies do gênero *Neisseria* ou outros microrganismos encontrados em mucosas.

Além da seletividade e especificidade com NG, os iniciadores deveriam ter o tamanho do produto amplificado (amplicons) entre 50 e 200pb, sendo este tamanho ideal na utilização de SYBR Green, para não haver formação de produtos inespecíficos durante a qPCR.

O LBMMS possui diversos projetos de pesquisas relacionados a testes moleculares com NG, e por este motivo, possui uma variedade de iniciadores já sintetizados prontos para utilização.

Onze iniciadores que estavam disponíveis no laboratório obedeciam ao critério de tamanho de amplicon (numerados de 1 a 11 em quadro 1), e por isso, foram selecionados para uma pesquisa de especificidade *in silico* e *in vitro*, para posterior utilização na padronização de qPCR. Todavia, esses iniciadores haviam sido sintetizados para finalidades diferentes da identificação presuntiva ou diagnóstico de NG, necessitando de uma etapa de pesquisa referente a sequência de nucleotídeos de cada iniciador através de BLASTing (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome), pra garantir que não houvesse sequências homologas com *N. meningitidis* ou outras *Neisseria* spp. no banco de dados NCBI GenBank. Os nomes dos iniciadores, bem como sua sequência de pares de bases, tamanho do produto amplificado e especificidade com NG estão apresentados no quadro 1.

Os iniciadores com alvo o gene *16s* e pseudogene *porA* (numerados 12 e 13 no quadro 1), que também estavam disponíveis no laboratório, tinham finalidade para a triagem de amostras sugestivas de NG, através de PCR multiplex convencional. Apesar do tamanho de amplicom ser maior que o recomendado para qPCR, esses genes utilizados são bem descritos na literatura, relatados como bem conservados e amplamente utilizados como genes confirmatórios de NG, e por isso, não fez necessária uma busca na base de dados NCBI para verificar especificidade.

Quadro 1. Lista dos 13 iniciadores selecionados para os testes de especificidade *in silico*.

| Numero | Iniciadores | Nome do gene | Iniciador Senso 5' -> 3' | Iniciador Antissenso 5' -> 3' | Tamanho do produto |
|--------|-------------|---|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 1 | NGO162 7 | phage associated protein | CTTCCCGGCTGTT TCTC TT | CTCCGTCCTCAAT CAT ACCG | 100pb |
| 2 | NGO093 6 | elongation factor P | ACGGTATGGAAG ACCAATGC | AGGCTCGGTGTAC TCG ACTT | 100pb |
| 3 | NGO060 2 | MerR family transcriptional regulator | ATCGGACGTGATG AATACGG | CCGCAAAGCGTTT GAT GT | 118pb |
| 4 | NGO206 0 | signal recognition particle receptor FtsY | GGAAACCGCAGC AAAAGTAG | CCCTTTGACGCTT TCT GCTA | 91pb |
| 5 | NGO009 3 | aroK shikimate kinase | CCCTTTGACGCTT TCTGCTA | GATTCGTGATCG CTG TCGT | 107pb |
| 6 | NGO198 9 | hypothetical protein | CACAGGACAATG GTGGTCAG | CAAACCAACCTGC CGT TTAC | 94pb |
| 7 | NGO209 4 | groES cochaperonin GroES | GTCCGCTGGATGT CAAAGC | CTTCTTCGCGCAT TAC CAAC | 102pb |
| 8 | NGO086 3 | hypothetical protein | TGTTGACGAGCA TAACGAG | TCAGCTCATCGAT GGT TTCC | 90pb |
| 9 | NGO008 3 | NADHdependent dehydratase PglD | CCTTCTCATCGA ACGCTAC | CGGATAGGCTTTC AGT TTGC | 104pb |
| 10 | NGO062 6 | murein transglycosylase | ACGGACATCGGG ATATATGG | GCCGACACCAAC ATTT TACC | 106pb |
| 11 | NGO185 4 | rplA 50S ribosomal protein L1 | GGTCTGATGCCAA ACCCTAA | ATACCTGCCTTGT CGG TACG | 107pb |
| 12 | <i>porA</i> | <i>porA</i> pseudogene | CGGCAGCATTCA ATTTGTT | TCAATGGATCGG TATCACTCG | 260pb |
| 13 | <i>16s</i> | gene <i>16s</i> | CGGAACGTACCG GGTAGC | GCTACCCACGCT TTCGGA | 648pb |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

5.3.1 Desenho de um iniciador

Os iniciadores citados acima, haviam sido selecionados pelo tamanho de produto gerado e especificidade, porém apresentavam propósito para utilização em PCR convencional, na identificação de espécie de NG, e para análise de expressão gênica, por RT-qPCR, diferente da intenção deste trabalho que é o uso em qPCR, e por isso, foi decidido não continuar com a

utilização deles, pois havia a possibilidade do reconhecimento de alvos inespecíficos durante os ciclos de amplificação.

Após a revisão da literatura, foi selecionado um par de iniciadores utilizando como alvo o pseudogene *porA* de NG, adaptado de Hjelmevoll e colaboradores (2006), o qual foi sintetizado pela empresa Sigma-Aldrich(®) para utilização na qPCR utilizando SYBR Green, com tamanho de pares de base adequado, garantindo maior especificidade (quadro 2).

Quadro 2. Iniciadores para qPCR

| Iniciador Senso 5' -> 3' | Iniciador Antissenso 5' -> 3' | Tamanho do produto |
|--------------------------|-------------------------------|--------------------|
| CCGGAAGTGGTTTCATCTGATT | GTTTCAGCGGCAGCATTCA | 102pb |

Fonte: Hjelmevoll et al., 2006.

5.4 PCR CONVENCIONAL PARA INICIADORES

Após extração do DNA bacteriano e seleção dos iniciadores, foi realizada a reação em cadeia da polimerase convencional a fim testar a integridade dos iniciadores selecionados e a viabilidade das cepas armazenadas à -80°C que tiveram seu DNA extraído. O protocolo utilizado (tabela 1 e tabela 2) descrito por Liu e colaboradores (2011) foi adaptado utilizando H₂O como controle negativo. Na PCR foram utilizados os reagentes GoTaq® DNA polimerase, MgCl₂ e Buffer (Promega, EUA), dNTPs (Ludwig biotec, Brasil) e iniciadores.

Tabela 1. Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na PCR simplex

| Reagentes | Volume | Concentração |
|----------------------|--------|--------------|
| H ₂ O | 13,6µL | - |
| Tampão 5X | 5µL | 1X |
| MgCl ₂ | 2µL | (25mM) |
| dNTPs | 0,2µL | (25mM) |
| Iniciador senso | 1µL | (0,3uM) |
| Iniciador antissenso | 1µL | (0,3uM) |
| Taq DNA Pol | 0,2µL | (1,5U/µL) |
| DNA | 2µL | - |
| Volume total | 25µL | - |

Fonte: Liu et al., 2011.

Tabela 2. Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na PCR multiplex

| Reagentes | Volume | Concentração |
|----------------------------------|--------|--------------|
| H ₂ O | 13,6µL | - |
| Tampão 5X | 5µL | 1X |
| MgCl ₂ | 2µL | (25mM) |
| dNTPs | 0,2µL | (25mM) |
| Iniciador senso <i>porA</i> | 0,75µL | (0,3uM) |
| Iniciador antissenso <i>porA</i> | 0,75µL | (0,3uM) |
| Iniciador senso <i>16s</i> | 0,25µL | (0,3uM) |
| Iniciador antissenso <i>16s</i> | 0,25µL | (0,3uM) |
| Taq DNA Polimerase | 0,2µL | (1,5U/µL) |
| DNA | 2µL | - |
| Volume total | 25µL | - |

Fonte: Liu et al., 2011.

Os ciclos de amplificação (tabela 3) foram programados da seguinte forma: 4 min a 94°C para desnaturação, e 30 ciclos de 1 minuto nas temperaturas 94°C, 55°C e 72°C para o pareamento dos iniciadores, seguido de 10 minutos a 72°C para a extensão, realizados em termociclador Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Tabela 3. Ciclos e temperaturas PCR convencional

| Ciclos | Temperatura (°C) | Tempo |
|--------|------------------|-------|
| 1x | 94 | 4min |
| 30x | 94 | 1min |
| | 55 | 1min |
| | 72 | 1min |
| 1x | 72 | 10min |

Fonte: LIAO et al., 2011.

Após amplificação, foi realizada eletroforese em gel de agarose (1,5% + 1µL de Brometo de etídio) com TBE 1X (Tris-Boro-Edta), em corrida de 200 volts durante 10 minutos, a fim de confirmar a amplificação. A revelação do gel foi realizada no ImageQuant™ LAS 500 (General Electrics, EUA).

5.5. PADRONIZAÇÃO qPCR

5.5.1 Padronização da concentração dos iniciadores

A síntese dos iniciadores foi realizada pela empresa Sigma-Aldrich (EUA), em escala de 25 nmol. Os primers foram ressuspensos em água RNase/DNase/Pirogênio free em concentração de 100 μM na solução estoque e armazenados em alíquotas de concentração 10 μM .

Na determinação da melhor concentração dos iniciadores, as concentrações testadas foram 0,2 μM , 0,4 μM , 0,6 μM e 0,8 μM de cada iniciador. A reação de qPCR foi realizada em triplicata e controle negativo, utilizando PowerUp SYBR Green master mix (Applied Biosystems, EUA) segundo o protocolo do fabricante, variando apenas a concentração dos iniciadores e da água da reação (tabela 4). A amplificação ocorreu utilizando o termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, EUA), em ciclagens programados da seguinte forma: 10 min a 95°C para desnaturação, e 40 ciclos de 15 segundos e 1 minuto, respectivamente, nas temperaturas 95°C e 60°C pareamento e extensão (tabela 5).

Tabela 4. Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na qPCR

| REAGENTES | Mix 0,2 μM | Mix 0,4 μM | Mix 0,6 μM | Mix 0,8 μM |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| SYBR Green Master Mix | 10 μL | 10 μL | 10 μL | 10 μL |
| IS (10 μM) | 0,4 μL | 0,8 μL | 1,2 μL | 1,6 μL |
| IA (10 μM) | 0,4 μL | 0,8 μL | 1,2 μL | 1,6 μL |
| H ₂ O | 4,2 μL | 3,4 μL | 2,6 μL | 1,8 μL |
| DNA (20ng) | 5 μL | 5 μL | 5 μL | 5 μL |
| TOTAL MIX | 20 μL | 20 μL | 20 μL | 20 μL |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022. Legenda: IS: Iniciador Senso; IA: Iniciador Antissenso.

Tabela 5. Ciclos e temperaturas qPCR

| Ciclos | Temperatura (°C) | Tempo |
|--------|------------------|-------|
| 1x | 95 | 10min |
| 40x | 95 | 15s |
| | 60 | 1min |

Fonte: Applied Biosystems

5.5.2 Padronização da concentração de DNA

Após definir a concentração ideal dos iniciadores para a qPCR, foi necessário determinar a eficiência dos iniciadores. Para isso, foram utilizadas cinco (5) concentrações diferentes de DNA a fim de construir uma curva padrão. As concentrações de DNA testadas foram 5, 10, 20, 40 e 80ng de DNA, sendo os testes realizados em triplicatas com controle negativo utilizando PowerUp SYBR Green master mix (Applied Biosystems, EUA), segundo o protocolo do fabricante, variando apenas a concentração de DNA e da água da reação (tabela 6). A amplificação ocorreu utilizando o termociclador CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, EUA), em ciclagens programadas da seguinte forma: 10 min a 95°C para desnaturação, e 40 ciclos de 15 segundos e 1 minuto, respectivamente, nas temperaturas 95°C e 60°C pareamento e extensão (tabela 5).

Tabela 6. Reagentes e suas respectivas concentrações utilizadas na qPCR

| REAGENTES | Mix 5ng DNA | Mix 10ng DNA | Mix 20ng DNA | Mix 40ng DNA | Mix 80ng DNA |
|-----------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| SYBR Green Master Mix | 10 µL | 10 µL | 10 µL | 10µL | 10µL |
| IS (10 µM) | 1,6µL | 1,6µL | 1,6µL | 1,6µL | 1,6µL |
| IA (10 µM) | 1,6µL | 1,6µL | 1,6µL | 1,6µL | 1,6µL |
| H ₂ O | 5,55µL | 4,3µL | 1,8µL | 4,8µL | 2,8µL |
| DNA | 1,25µL | 2,5µL | 5µL | 2µL | 4µL |
| TOTAL MIX | 20µL | 20µL | 20µL | 20µL | 20µL |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022. Legenda: IS: Iniciador Senso; IA: Iniciador Antissenso.

5.5.3 qPCR de validação

Após definir a melhor concentração dos iniciadores e de DNA a ser utilizada na padronização, foi realizada uma qPCR de validação contendo todos 40 isolados de microrganismos extraídos dos quais, 11 eram cepas de referência WHO, 24 eram isolados clínicos de NG provenientes do projeto de vigilância de resistência antimicrobiana que já haviam sido identificados por outras metodologias, 3 isolados de bactérias que tiveram identificação discordante em metodologias do laboratório (MALDI-TOF (bioMérieux, France), PCR convencional e VITEK2), uma cepa de *Neisseria sicca* e uma cepa de *Neisseria elongata*.

O protocolo utilizado foi aquele que apresentou melhor eficiência independente da concentração de DNA (tabela 7), e os reagentes foram preparados de acordo com o número de amostras processadas e controles negativos e positivos. A amplificação ocorreu nas mesmas condições descritas anteriormente (tabela 5)

Tabela 7. Protocolo utilizado na qPCR

| REAGENTES | Mix |
|-----------------------|----------------------------|
| SYBR Green Master Mix | 10 μ L |
| IS (10 μ M) | 1,6 μ L |
| IA (10 μ M) | 1,6 μ L |
| H ₂ O | 4,8 μ L |
| DNA (40ng) | 2 μ L |
| TOTAL MIX | 20μL |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022. Legenda: IS: Iniciador Senso; IA: Iniciador Antissenso.

5.6 qPCR DE COLÔNIA

Durante a padronização da qPCR, também foi realizada, em conjunto, a avaliação da reação direto de colônia de NG, feita em triplicata, na qual utilizando uma alça calibrada de 1 μ L, uma colônia da cepa ATCC (ATCC 49226®) de NG, foi inoculada diretamente no mix de qPCR (tabela 7) já pipetado na placa de PCR de 96 poços.

5.7 CUSTO BENEFÍCIO

Para análise custo-benefício das técnicas, foram feitos cálculos com base nos preços dos insumos (ponteiras e microtubos) e reagentes utilizados adquiridos do laboratório por meio de notas fiscais e contato com algumas empresas. A tabulação dos valores foi realizada no programa Microsoft Excel® 2019 atribuindo os valores para o custo de realização de três testes (considerando uma amostra, controle negativo e controle positivo), e vinte testes (dezoito amostras, controle negativo e controle positivo) para cada uma das técnicas (PCR convencional e PCR em tempo real), com base no protocolo de cada técnica. Além do custo, também foi avaliado e levado em consideração os aspectos como tempo de preparo e processamento de amostras em cada uma das técnicas.

Para a realização da técnica de PCR convencional, utiliza-se ponteiras de 10, 20, 100 e 200 μ L c/filtro e microtubos de 0,2 e 0,5mL. Os reagentes utilizados são: GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, USA), dNTPs (Ludwig biotec, Brasil) e par de iniciadores. Além da etapa de eletroforese, na qual são utilizadas: ponteiras de 20 μ L com filtro, gel de agarose 2%, tampão de corrida TBE 1X, padrão tamanho molecular de corrida 100pb e brometo de etídio.

A qPCR utiliza como insumos ponteiras de 10, 20, 100 e 200 μ L com filtro e microtubos de 0,5 e 1,5mL, placa de 96 poços para PCR e adesivo óptico. Os únicos reagentes utilizados nesta técnica são: PowerUp SYBR Green master mix (Applied Biosystems, EUA) e o respectivo par de iniciadores.

6 RESULTADOS

6.1 CULTURA E EXTRAÇÃO DE DNA

Isolados tiveram seu DNA extraído pela técnica de extração por fervura e a quantidade de DNA extraído de cada isolado é apresentado no quadro 3.

Quadro 3. Isolados bacterianos e quantificação de DNA extraído

| | Cepa | DNA (ng/ul) | | | Cepa | DNA (ng/ul) |
|----|--------|----------------|--|----|-----------------------|----------------|
| 1 | ATCC | 26,5 | | 21 | BH 58 | 41,5 |
| 2 | WHO O | 30,5 | | 22 | BH 72 | 39,0 |
| 3 | WHO K | 27,0 | | 23 | BH 73 | 47,5 |
| 4 | WHO G | 29,2 | | 24 | BH 93 | 37,5 |
| 5 | WHO L | 24,0 | | 25 | BH 94 | 49,0 |
| 6 | WHO F | 35,5 | | 26 | RE 31 | 76,3 |
| 7 | WHO M | 41,5 | | 27 | RE 32 | 87,3 |
| 8 | WHO N | 55,0 | | 28 | RE 34 | 51,5 |
| 9 | WHO P | 76,5 | | 29 | RE 35 | 61,5 |
| 10 | WHO X | 59,2 | | 30 | RE 96 | 51,0 |
| 11 | WHO F | 60,3 | | 31 | RE 98 | 27,5 |
| 12 | WHO V | 71,6 | | 32 | RE 100 | 66,0 |
| 13 | RIB 31 | 77,3 | | 33 | RE 92 | 51,0 |
| 14 | RIB 42 | 37,0 | | 34 | MA 76 | 66,0 |
| 15 | RIB 53 | 7,6 | | 35 | MA 77 | 71,0 |
| 16 | RIB 92 | 49,0 | | 36 | MA 68 | 55,3 |
| 17 | RIB 93 | 57,0 | | 37 | <i>H. influenzae</i> | 26,6 |
| 18 | BH 33 | 36,0 | | 38 | <i>N. sicca</i> | 49,0 |
| 19 | BH 43 | 27,3 | | 39 | <i>N. elongata</i> | 55,0 |
| 20 | BH 53 | 37,0 | | 40 | <i>M. catarrhalis</i> | 17,0 |

Legenda: Cepas WHO: Cepas de referência da Organização Mundial da Saúde. RIB: Isolados bacterianos oriundos da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. BH: Isolados bacterianos oriundos da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. RE: Isolados bacterianos oriundos da cidade de Recife, Pernambuco. MA: Isolados bacterianos oriundos da cidade de Manaus, Amazonas. ATCC: Cepa padrão de NG. Moraxella: *Moraxella catarrhalis*. *H. influenzae*: *Haemophilus influenzae*. *N. sicca*: *Neisseria sicca*. *N. elongata*: *Neisseria elongata*. Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

6.2 SELEÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES E PCR CONVENCIONAL

Os iniciadores que segundo a ferramenta BLASTing apresentavam sequências homólogas a múltiplas cepas de *Neisseria* spp. ou qualquer cepa de *N. meningitidis* foram descartados e considerados como ‘sem especificidade’. Aqueles que apresentavam sequências com similaridade a outros microrganismos, ou com até duas cepas de *Neisseria* spp., foram considerados com ‘alguma especificidade’ (quadro 4). Esses iniciadores apresentaram amplificação *in vitro*, porém as análises posteriores não foram realizadas com estes iniciadores pois o objetivo do trabalho é justamente diferenciar NG de outras *Neisserias* com uma qPCR simplex.

Os iniciadores do pseudogene *porA* e gene *I6s* (quadro 4) foram avaliados *in vitro* utilizando a técnica PCR-multiplex, amplificando a sequência de ambos os iniciadores simultaneamente. Quatro isolados de NG que tiveram seu DNA extraído apresentaram amplificação pelos iniciadores, sendo posteriormente revelado com brometo em gel de agarose 1,5%, com amplificação de produto de 200pb pra *porA* e 650pb para *I6s*. Esses também tiveram seu uso descontinuado devido ao tamanho de produto amplificado.

Quadro 4. Resultado dos 13 iniciadores selecionados para os testes de especificidade

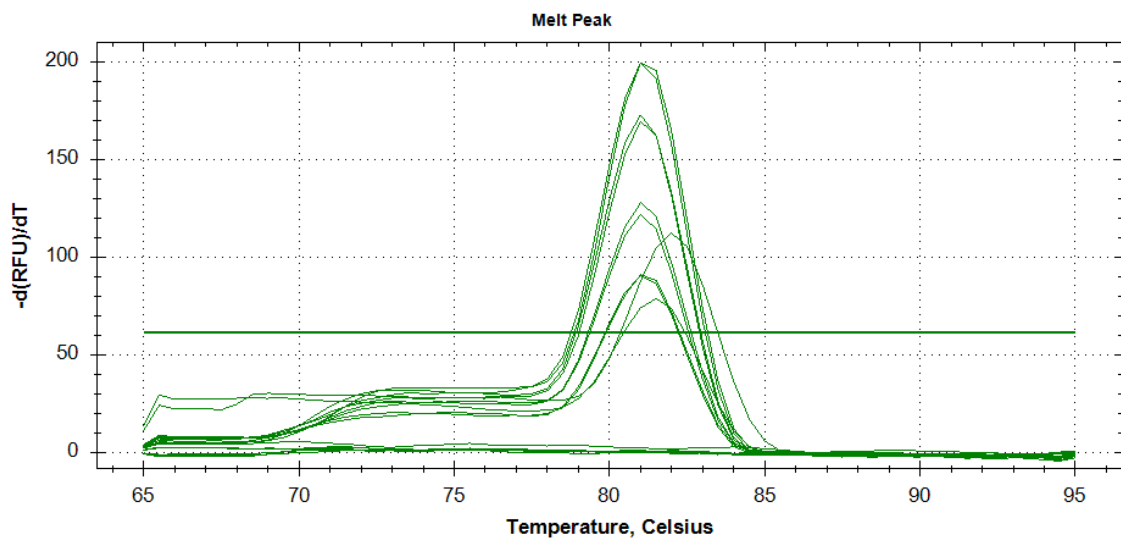
| Numero | Iniciadores | Nome do gene | Iniciador Senso 5' - > 3' | Iniciador Antissenso 5' - > 3' | Tamanho do produto | BLAST |
|--------|-------------|---|---------------------------------|-----------------------------------|--------------------|----------------------------|
| 1 | NGO162 7 | phage associated protein | CTTCCCGGCTGT TTCTC TT | CTCCGTCCTCAATC AT ACCG | 100pb | Sem especificidade |
| 2 | NGO093 6 | elongation factor P | ACGGTATGGAA GACCAATGC | AGGCTCGGTGTACT CG ACTT | 100pb | Sem especificidade |
| 3 | NGO060 2 | MerR family transcriptional regulator | ATCGGACGTGAT GAATACGG | CCGCAAAGCGTTTG AT GT | 118pb | Sem especificidade |
| 4 | NGO206 0 | signal recognition particle receptor FtsY | GGAAACCGCAG CAAAAGTAG | CCCTTTGACGCTTT CT GCTA | 91pb | Alguma especificidade |
| 5 | NGO009 3 | aroK shikimate kinase | CCCTTTGACGCT TTCTGCTA | GATTTCGTGATCGC TG TCGT | 107pb | Sem especificidade |
| 6 | NGO198 9 | hypothetical protein | CACAGGACAAT GGTGGTCAG | CAAACCAACCTGCC GT TTAC | 94pb | Sem especificidade |
| 7 | NGO209 4 | groES cochaperonin GroES | GTCCGCTGGATG TCAAAGC | CTTCTTCGCGCATT AC CAAC | 102pb | Alguma especificidade |
| 8 | NGO086 3 | hypothetical protein | TGTTGACGAGC ATAACGAG | TCAGCTCATCGATG GT TTCC | 90pb | Sem especificidade |
| 9 | NGO008 3 | NADHdependent dehydratase PglD | CCTTCCTCATCG AACGCTAC | CGGATAGGCTTTCA GT TTGC | 104pb | Sem especificidade |
| 10 | NGO062 6 | murein transglycosylase | ACGGACATCGG GATATATGG | GCCGACACCAACAT TT TACC | 106pb | Alguma especificidade |
| 11 | NGO185 4 | rplA 50S ribosomal protein L1 | GGTCTGATGCCA AACCTAA | ATACCTGCCTTGTC GG TACG | 107pb | Sem especificidade |
| 12 | <i>porA</i> | <i>porA</i> pseudogene | CGGCAGCATTC AATTTGTT | TCAATGGATCGGT ATCACTCG | 260pb | Alta especificidade |
| 13 | <i>16s</i> | gene 16s | CGGAACGTACC GGGTAGC | GCTACCCACGCTT TCGGA | 648pb | Alta especificidade |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022. Legenda: Sem especificidade: Iniciadores que apresentavam seqüências homologas a cepas de *Neisseria Meningitidis*; Alguma especificidade: Iniciadores que não apresentavam seqüências homologas a *Neisseria Meningitidis*, porém apresentavam para outros microrganismos; Alta especificidade: Iniciadores que não apresentava homologia a nenhuma cepa de *Neisseria* spp. ou outros microrganismos que colonizam mucosas.

6.3 PADRONIZAÇÃO qPCR

O método qPCR requer uma série de padronizações para que os experimentos a serem realizados ocorram com alta eficiência, uma delas é a determinação da concentração de uso dos oligonucleotídeos iniciadores. A Figura 2 apresenta a curva de dissociação das quatro concentrações distintas dos iniciadores do pseudogene *porA* sintetizado, utilizadas para determinar a melhor concentração iniciadores na identificação de NG. Segundo a análise das imagens, foi determinado que o protocolo que apresentou o melhor resultado para continuação do trabalho foi o que continha 1,6 μ L de cada iniciador.

Figura 2. Curva de dissociação dos iniciadores *porA*



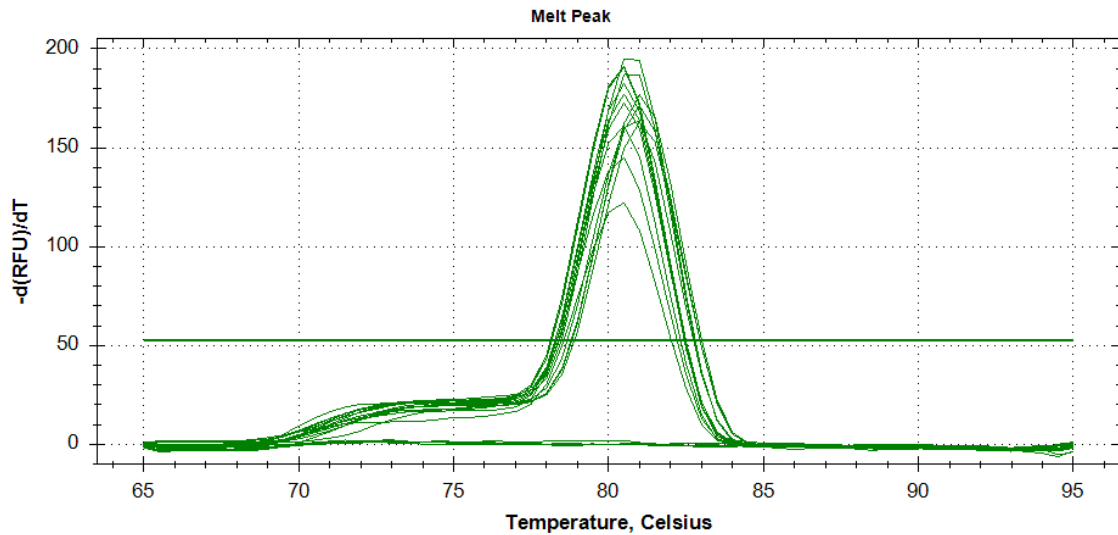
Legenda: Curva de dissociação obtida através da diluição dos iniciadores nas concentrações de 0,4 μ L, 0,8 μ L, 1,2 μ L e 1,6 μ L. Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Após a escolha da concentração ideal de uso dos iniciadores, a avaliação da eficiência da qPCR foi realizada utilizando cinco concentrações de DNA diferentes. Na figura 3 é possível observar que houve a amplificação em todas as concentrações testadas.

Um gráfico para avaliar a eficiência da qPCR nas concentrações testadas foi plotado (gráfico 1), e assim foi obtido o *slope*, que é o coeficiente angular da reta. Com esse valor calculou-se a eficiência da reação, em porcentagem (%), a partir da equação de Eficiência = $10(-1/\text{slope}) - 1$, e segundo a literatura, é recomendado que o valor da eficiência fique entre 90% e 110% (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016), o que corresponde ao valor obtido durante a

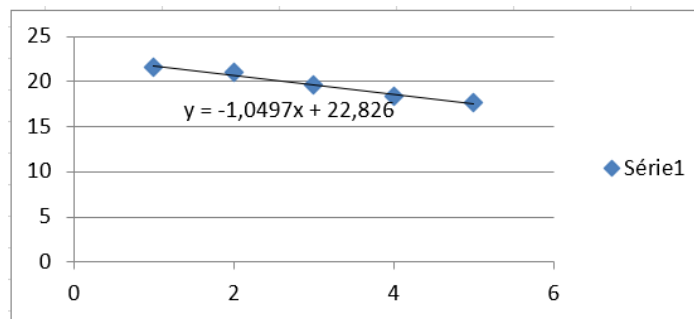
padronização da qPCR para identificação de NG (94%). Além da eficiência, para definição do protocolo levou-se em consideração a recomendação do fabricante do kit PowerUp SYBR Green master mix (Applied Biosystems, EUA) para definir a concentração de DNA a se utilizar, que era recomentado 1-100ng de DNA. Assim, analisando todos os fatores, a concentração escolhida para padronizar a qPCR foi a de 40ng de DNA por isolado.

Figura 3. Curva de dissociação diluição DNA



Legenda: Curva de dissociação obtida após diluição do DNA em: 5ng, 10ng, 20ng, 40ng, 80ng. Fonte: Desenvolvido pelo autor, 2022.

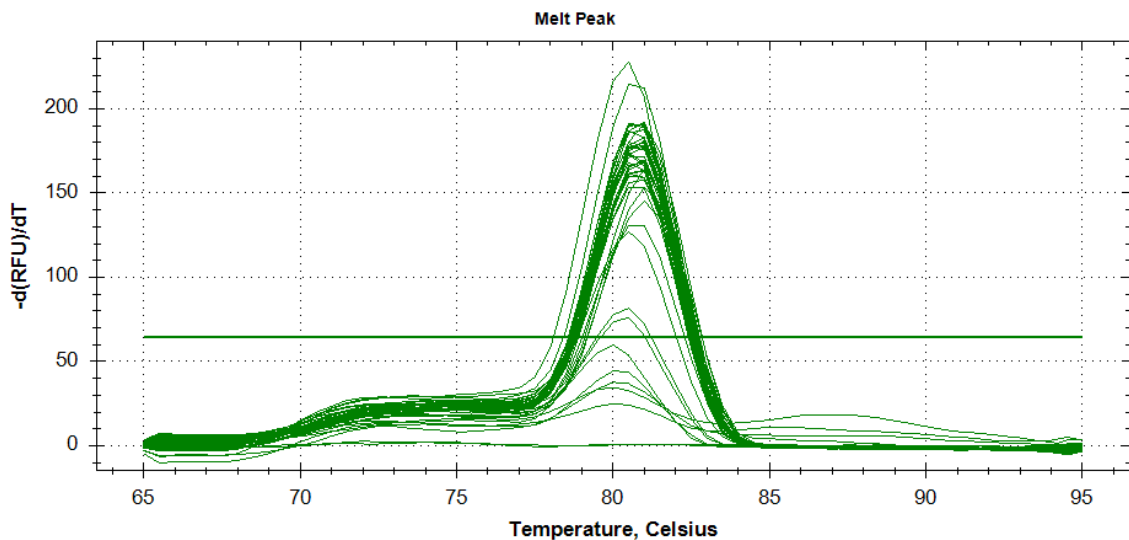
Gráfico 1. Regressão Linear dos valores de CT dos 5 pontos de diluição do DNA



Legenda: Eixo X: Diluição do DNA: 1: 5ng, 2: 10ng, 3: 20ng, 4: 40ng, 5: 80ng. Eixo Y: Ciclos de amplificação C(t). Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Na qPCR de validação, todas as 11 cepas de referência WHO e cepa ATCC de NG apresentaram amplificação com um C(t) semelhante entre 13 e 23 (figura 5). 3 isolados (Figura 5. MA 68, 76 e 77) que pertenciam ao banco de bactérias do laboratório, tiveram uma identificação discordante por outras metodologias (*Moraxella catarrhalis* por MALDI-TOF e NG por VITEK2), apresentaram um C(t) relativamente próximo os isolados de NG, entre 20 e 29. Todos os isolados bacterianos que faziam parte do projeto de vigilância já possuíam prévia identificação como NG, identificados por PCR convencional, MALDI-TOF (VITEK MS, bioMérieux, France) ou VITEK2, e durante a qPCR de validação tiveram seu DNA amplificado, corroborando que se tratavam de NG, com um C(t) entre 14 e 17. *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria elongata* apresentaram amplificação tardia, com C(t) maiores do que 33. A figura 5 representa todos os C(t) obtidos na qPCR de validação, além do mapa de disposição dos isolados na placa, e a figura 4 a curva de dissociação de todos os isolados.

Figura 4. Curva de dissociação qPCR de validação



Legenda: Curva de dissociação qPCR de validação obtida através de 40 isolados testados para validação da qPCR. Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Figura 5. Mapa de disposição dos isolados e valores de C(t) na qPCR de validação

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------|-------|--------|--------|-------|-------|--------|------------|--|-------|--|--|--|
| A | Content Sample C(t) | | | | | | | | | | | | |
| B | Content Sample C(t) | WHO V | WHO F | RIB 42 | BH 53 | RE 31 | RE 98 | Moraxella | | COLO | | | |
| | | 14,06 | 13,68 | 16,39 | 15,97 | 14,96 | 16,66 | 34,61 | | 15,15 | | | |
| C | Content Sample C(t) | WHO X | WHO G | RIB 53 | BH 58 | RE 32 | RE 100 | H. influen | | COLO | | | |
| | | 14,03 | 17,75 | 23,11 | 15,76 | 14,42 | 15,47 | 36,36 | | 17,70 | | | |
| D | Content Sample C(t) | WHO K | WHO Y | RIB 92 | BH 72 | RE 34 | ATCC | N. sicca | | COLO | | | |
| | | 17,78 | 14,84 | 16,06 | 35,65 | 16,23 | 13,40 | | | 18,09 | | | |
| E | Content Sample C(t) | WHO O | WHO M | RIB 93 | BH 73 | RE 35 | MA 68 | CQ Arg 43 | | | | | |
| | | 17,50 | 13,91 | 16,00 | 15,81 | 15,93 | 24,41 | 33,91 | | | | | |
| F | Content Sample C(t) | WHO L | WHO N | BH 33 | BH 93 | RE 92 | MA 76 | CP | | | | | |
| | | 16,01 | 13,36 | 15,13 | 15,30 | 15,98 | 29,22 | 17,50 | | | | | |
| G | Content Sample C(t) | WHO P | RIB 31 | BH 43 | BH 94 | RE 96 | MA 77 | CN | | | | | |
| | | 15,78 | 16,24 | 17,02 | 15,41 | 15,82 | 20,31 | | | | | | |
| H | Content Sample C(t) | | | | | | | | | | | | |

Legenda: C(t): Número de ciclos para a amplificação. Cepas WHO: Cepas de referência da Organização Mundial da Saúde. RIB: Isolados bacterianos oriundos da cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. BH: Isolados bacterianos oriundos da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. RE: Isolados bacterianos oriundos da cidade de Recife, Pernambuco. MA: Isolados bacterianos oriundos da cidade de Manaus, Amazonas. ATCC: Cepa padrão de NG. Moraxella: *Moraxella catarrhalis*. H. influen: *Haemophilus influenzae*. N. sicca: *Neisseria sicca*. CQ Arg 43: *Neisseria elongata*. CP: Controle Positivo. CN: Controle Negativo. COLO: qPCR diretamente de colônia. Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

6.4 qPCR DE COLÔNIA

A qPCR de colônia de ATCC de NG ocorreu simultaneamente com a qPCR de validação (quadros em destaque figura 5), e valor de C(t) obtido durante a amplificação indica que a qPCR de colônia obteve resultados semelhantes aos isolados que tiveram seu material genético extraído através de fervura.

6.5 CUSTO BENEFÍCIO

Os quadros 8 e 10 apresentam o preço para realização para três testes de cada técnica. Nos quadros 9 e 11 pode ser observado o custo para vinte testes com base nos preços dos

reagentes/insumos e nas quantidades utilizadas em cada protocolo. Foram calculados os custos da PCR convencional utilizada atualmente na rotina do LBMMS e da qPCR (método a ser implantado).

Quadro 5. Preço por unidade dos insumos

| Insumos | Valor Unitário (R\$) |
|------------------------|----------------------|
| Ponteiras 10 μ L | 0,18 |
| Ponteiras 20 μ L | 0,41 |
| Ponteiras 100 μ L | 0,41 |
| Ponteiras 200 μ L | 0,41 |
| Ponteiras 1000 μ L | 0,41 |
| Tubos 0,2mL | 0,34 |
| Tubos 0,5mL | 0,46 |
| Tubos 1,5mL | 1,53 |
| Placa 96 poços | 28,92 |
| Adesivo óptico | 12,4 |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Quadro 6. Valor total Eletroforese

| Eletroforese | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Reagente | Valor por amostra (R\$) |
| Gel de agarose 2% | 1,85 |
| Tampão de corrida TBE 1x | 2,03 |
| Padrão Tamanho Molecular 100pb | 3,09 |
| Ponteiras 20 μ L com filtro | 1,35 |
| Loading Buffer e Brometo de etídio | 0,02 |
| Sub-total | 8,52 |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Quadro 7. Preço por μ L dos reagentes

| REAGENTES | | | |
|-----------------------------|-------------|-------------------|---------------------|
| REAGENTES | Preço (R\$) | Volume (μ L) | Valor μ L (R\$) |
| GoTaq® Flexi DNA Polymerase | 196 | 100 | 1,96 |
| dNTPs | 350 | 1000 | 0,35 |
| SYBR Green | 2.314,28 | 2500 | 0,93 |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Quadro 8. Valor total para PCR convencional 3 amostras

| PCR CONVENCIONAL PARA 3 AMOSTRA | | |
|---------------------------------|-----------------|-------------|
| Insumos e reagentes | Quantidade | Preço (R\$) |
| Ponteiras 10 μ L | 7 | 1,26 |
| Ponteiras 20 μ L | 1 | 0,41 |
| Ponteiras 100 μ L | 1 | 0,41 |
| Tubos 0,2mL | 2 | 0,68 |
| GoTaq® Flexi DNA Polymerase | 2 μ L | 3,92 |
| dNTPs | 2 μ L | 0,7 |
| Eletroforese (total) | 1 | 11,22 |
| TOTAL | R\$ 18,6 | |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Quadro 9. Valor total para PCR convencional 20 amostras

| PCR CONVENCIONAL PARA 20 AMOSTRAS | | |
|-----------------------------------|-----------------|-------------|
| Insumos e reagentes | Quantidade | Preço (R\$) |
| Ponteiras 10 μ L | 21 | 3,78 |
| Ponteiras 20 μ L | 2 | 0,82 |
| Ponteiras 100 μ L | 3 | 1,23 |
| Ponteiras 200 μ L | 1 | 0,41 |
| Tubo 0,5mL | 1 | 0,46 |
| GoTaq® Flexi DNA Polymerase | 40 μ L | 39,2 |
| dNTPs | 40 μ L | 7 |
| Eletroforese (total) | 1 | 1,70 |
| TOTAL | R\$ 54,6 | |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Quadro 10. Valor total para qPCR de 3 amostras

| qPCR PARA 3 AMOSTRAS | | |
|----------------------|------------------|-------------|
| Insumos e reagentes | Quantidade | Preço (R\$) |
| Ponteiras 100µL | 4 | 1,64 |
| Ponteiras 10µL | 4 | 1,26 |
| Tubos 0,2mL | 1 | 0,34 |
| Placa 96 poços | 1 | 28,92 |
| Adesivo óptico | 1 | 12,4 |
| MIX SYBR Green | 10µL | 27,9 |
| TOTAL | R\$ 71,90 | |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Quadro 11. Valor total para qPCR 20 amostras

| PCR CONVENCIONAL PARA 20 AMOSTRAS | | |
|-----------------------------------|------------------|-------------|
| Insumos e reagentes | Quantidade | Preço (R\$) |
| Ponteiras 100µL | 24 | 9,84 |
| Ponteiras 200µL | 1 | 0,41 |
| Tubo 0,5mL | 1 | 0,46 |
| Placa 96 poços | 1 | 1,44 |
| Adesivo óptico | 1 | 0,62 |
| MIX SYBR Green | 200µL | 18,6 |
| TOTAL | R\$ 31,37 | |

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

7 DISCUSSÃO

Atualmente projeto nacional de vigilância da resistência de *Neisseria gonorrhoeae* aos antimicrobianos no Brasil, realizado pelo LBMMS, utiliza PCR convencional na identificação dos isolados clínicos, metodologia laboriosa para a visualização dos resultados, diferente da técnica de qPCR padronizada neste estudo. Para a padronização de qPCR são necessários alguns componentes e etapas que garantam a sua reprodutibilidade e eficiência, para que não haja detecção de produtos inespecíficos, principalmente com microrganismos que colonizam o mesmo sítio anatômico ou apresentam semelhança genética.

NG pertencente ao gênero *Neisseria*, o qual é composto por bactérias comensais e *N. meningitidis*, e, apesar dessas duas bactérias ocuparem nichos diferentes e serem fenotipicamente distintas, estão intimamente relacionadas, pois apresentam alta homologia em seu DNA genômico, sendo necessário meios que garantam a diferenciação desses patógenos em suas identificações (HJELMEVOLL *et al.*, 2006).

A escolha de um gene alvo é o ponto principal garantir uma qPCR com especificidade, necessitando de ferramentas que possibilitam averiguar reação cruzada com genes equivalentes ou a presença do mesmo gene em outros microrganismos. Segundo a literatura, o pseudogene *porA*, é estável, permanece inalterado ao longo do tempo, sendo o alvo de amplificação escolhido neste trabalho para a padronização da qPCR. Os iniciadores foram desenhados utilizando como referência o trabalho de Hjelmvoll e colaboradores (2006), no qual foi utilizado um amplo painel de microrganismos, incluindo patógenos comensais e bactérias frequentemente encontradas em áreas genitais. Os autores demonstraram que o pseudogene *porA* é altamente conservado em NG, e suficientemente diferente do gene *porA* de *N. meningitidis* para não haver amplificação cruzada entre essas bactérias. Além disso, pelo grau de conservação e “exclusividade” na sequência de nucleotídeos, permite desenhar iniciadores que amplificam um produto de 102pb, ideal para qPCR.

N. meningitidis e NG apresentam porinas em suas membranas externas que permitem a troca de íons entre as bactérias e o ambiente onde se encontram (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Enquanto NG expressa apenas a proteína *PorB*, *N. meningitidis* é a única espécie de *Neisseria* conhecida por expressar tanto a proteína *PorA* quanto *PorB*. E, apesar do fato das duas bactérias serem geneticamente semelhantes e apresentarem a expressão de uma mesma porina, o estudo de Ian e colaboradores (2002) relata a presença de um pseudogene de *PorA*, uma proteína de superfície silenciada, presente no genoma de NG, que apresenta baixo nível de polimorfismo, ausente em espécies comensais de *Neisseria*, e é suficientemente diferente para discriminar NG

e *N. meningitidis*, fato que foi confirmado por Unemo e colaboradores (2005) (FEAVERS; MAIDEN, 2002; UNEMO; NORLÉ N; FREDLUND, 2005).

A padronização de uma qPCR requer etapas que garantam o funcionamento e a reprodutibilidade da metodologia. A análise da curva de dissociação ao final da amplificação é uma maneira mais simples e direta de verificar a especificidade da reação. Segundo a literatura, apenas um pico deve ser observado após a amplificação de uma qPCR (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016), efeito este que foi observado na padronização da metodologia neste trabalho (figura 5). Segundo Bustin e colaboradores (2009), eficiência da amplificação por PCR deve ser estabelecida através de curvas de calibração, pois tal calibração fornece indicação reprodutível e rápida da robustez, eficiência média e reprodutibilidade do ensaio de PCR, que neste estudo foi realizada através de concentrações diferentes de DNA, tendo como resultado uma eficiência de 94%, próximo ao valor preconizado (90-110%). Além disso, ferramentas como o BLAST, ou pesquisas equivalentes, são necessárias para projetar o ensaio com especificidade, para verificação de sequências homologas e amplificação de alvos inesperados (BUSTIN *et al.*, 2009). Posteriormente à verificação da eficiência, foi realizada uma qPCR de validação, utilizando um painel com diversos isolados clínicos identificados como NG (por PCR convencional), cepas de referência de NG, bactérias que apresentaram identificação discordante em outras metodologias de identificação, cepas de *Neisserias* comensais e outras bactérias. A qPCR se provou eficiente na amplificação de todas as cepas de referência e isolados clínicos que já haviam sido identificados por outras metodologias como NG, com valores de C(t) - que corresponde ao número de amplificações necessárias para amplificar o DNA - semelhante entre esses isolados (APPLIED BIOSYSTEMS, 2016), entre 13 e 23. Os isolados que não eram NG (*Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria elongata*) apresentaram amplificação tardia, com C(t) maiores do que 33, quase o dobro das cepas de referência. Os isolados com identificação discordantes por outras metodologias, obtiveram o valor de C(t) entre 20 e 29.

Além disso, a qPCR de colônia obteve resultados semelhantes às amostras que tiveram seu DNA extraído por fervura na temperatura de 100°C, com C(t) entre 15 e 18, indicando que a temperatura inicial a qual a qPCR utiliza para separar a dupla-fita DNA da amostra (94/95°C), pode ser eficaz na extração de material genético suficiente para a amplificação de um alvo e os restos celulares presente nas amostras não atrapalham a reação de qPCR necessitando de mais testes para uma possível execução na rotina laboratorial, pois a técnica simplificaria a

metodologia de identificação bacteriana, podendo ser utilizada para triagem rápida e fácil de NG, otimizando o tempo de trabalho (BERGKESSEL; GUTHRIE, 2013).

A qPCR como forma de substituir a PCR convencional em um laboratório, torna a rotina menos laboriosa, de forma que o processamento de muitas amostras não implica gasto maior de tempo por conta de etapas como a eletroforese para visualização do produto amplificado, já que na qPCR os produtos podem ser visualizados ao passo em que a reação acontece (DANIEL; VIEIRA, 2018). Segundo Harshitha e colaboradores (2021), o corante SYBR Green é uma maneira mais rápida do que a confirmação dos produtos de PCR por eletroforese, e menos complexa e menos cara que utilização de sondas de hidrólise para identificação, tendo um ótimo custo-benefício, ao passo que o protocolo para a confirmação de espécies em laboratório torna-se mais rápido e de menor custo que as outras técnicas de NAATS (HARSHITHA, 2021). Este efeito foi observado neste trabalho, pois, apesar da qPCR para identificação de isolados custar mais que a PCR convencional no processamento de três amostras, quanto maior o número de isolados processados simultaneamente pela qPCR menor o custo de execução, custando menos quando comparado com a técnica convencional na análise de mais de vinte amostras simultaneamente. Além disso, ainda apresenta melhores benefícios na sua utilização, pois além de ser mais sensível, e capaz de processar até 96 amostras de uma vez, já que que a placa de 96 poços pode comportar 94 amostras de isolados além do controle negativo e positivo em uma mesma análise, otimizando a rotina de trabalho, com um tempo de processamento e resultado em até 2 horas, sem a necessidade de etapa posteriores, que podem aumentar a chance de erro devido a grande quantidade de amostras. Além disso, a técnica apresenta: a) mais agilidade, b) apresenta maior confiança e chances de acerto, devido a menor manipulação humana durante o processo, c) é mais específica e mais sensível que a PCR convencional e d) menor emprego de mão de obra, pois utiliza-se a mesma placa para o processo inteiro. Esse conjunto de fatores evidencia as vantagens reais dessa técnica sobre a PCR convencional, que atualmente é executada no LBMMS.

Apesar do LBMMS não possuir cepas de referência de *Neisseria meningitidis* e *Neisserias* comensais para que fosse possível ampliar o painel de microrganismos testados, a padronização apresentou resultados satisfatório para a identificação de isolados clínicos, sendo necessário, que no futuro, se façam testes utilizando múltiplas cepas de referência diferentes de NG, a fim de validar o método com alta especificidade. Além disso, antes da técnica ser implementada no LBMMS, uma PCR convencional deve ser realizada para verificar a compatibilidade de identificação entre as técnicas. Devido o termociclador utilizado para padronizar a qPCR ter alta demanda de utilização, algumas etapas ainda são necessárias para

ratificar a padronização apresentada neste trabalho, pois não houve tempo hábil para a finalização, necessitando que no futuro elas sejam executadas para uma utilização plena na rotina laboratorial do LBMMS.

8 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que:

Uma padronização de qPCR, para identificação de patógenos, demanda etapas cruciais para um funcionamento pleno;

A identificação de NG por qPCR é uma forma mais rápida e menos laboriosa que a PCR convencional;

A qPCR, com os iniciadores escolhidos, apresentou concordância quando comparada com amostras identificadas por outras técnicas;

A PCR convencional apresentou um menor custo para a análise 1 amostra que a em tempo real, porém, é mais trabalhosa no processamento de muitas amostras;

O processamento de múltiplas amostras através de qPCR diminui o custo da técnica, diminuindo o valor conforme aumenta o número de amostras processadas ficando mais barata que a outra técnica.

Perspectivas:

Ampliação do painel de bactérias utilizando múltiplas cepas de referência diferentes de NG, a fim de validar o método com alta especificidade.

REFERÊNCIAS

- APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide for Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments**. Disponível em: <http://appliedbiosystems.gene-quantification.info>, 2007. Acesso em: 18 de fev. 2022.
- BRASIL. **Consulta de Nomes Técnicos de Produtos para Saúde**. Disponível em: <https://consultas.anvisa.gov.br/#/nomes-tecnicos/>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- BAZZO, M. L. et al. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015-16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1854–1861, 2018.
- BERNARDINI, G. et al. Proteome analysis of *Neisseria meningitidis* serogroup A. **Proteomics**, v. 4, n. 10, p. 2893–2926, 2004.
- BERGKESSEL, MEGAN; GUTHRIE, CHRISTINE. Colony PCR. *Methods in Enzymology*. [S.l.]: **Academic Press Inc.**, v. 529. p. 299–309, 2013.
- BHANOOTHU, VENAKNNA; VENKATESAN, Vijayalakshmi. Conventional polymerase chain reaction and amplification refractory mutation system-multi-gene/ multi-primer PCR in the diagnosis of female genital tuberculosis. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 3, p. 267–281, 2019.
- BUSTIN, STEPHEN A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT). **Atenção Integral às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis (IST) (Ministério da Saúde)**, 2021. Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2021/20210422_Relatorio_PCDT_IST_SECRETARIO_588_2021.pdf. Acesso em: 18 de mai. 2022.
- BRASIL. Cultura, Isolamento e Identificação de *Neisseria gonorrhoeae*. **Ministério da Saúde**, p. 1–76, 1997.
- COSTA-LOURENÇO, A. P. R. DA et al. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: history, molecular mechanisms and epidemiological aspects of an emerging global threat. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 617–628, 2017.
- DELCOUR, A. H. **NIH Public Access**, 1794(5), 808–816. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>. Outer. v. 1794, n. 5, p. 808–816, 2010.
- DANIEL, Bsc; VIEIRA, Perez. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <www.etall.hpg.com.br>. Acesso em: 13 jul. 2022.

FIFER, H.; ISON, C. A. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* in low-prevalence settings: a review of the evidence. **Sexually Transmitted Infections**, v. 90, n. 8, p. 577–579, 2014.

FEAVERS, IAN M; MAIDEN, MARTIN C J. A gonococcal *porA* pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of *Neisseria gonorrhoeae*. [S.l: s.n.], 2002.

GUEDES, D. S. Construção e validação de instrumentos para consulta de enfermagem às pessoas com infecções sexualmente transmissíveis. **Nuevos sistemas de comunicación e información**, p. 2013–2015, 2021.

GUEST, P. C. ED. Multiplex Biomarker Techniques. **Methods in Molecular Biology**, v. 1546, p. 317 pp., 2017.

HARSHITHA, R. Biochem Molecular Bio Educ - Harshitha - **Real-time quantitative PCR A tool for absolute and relative quantification.pdf**, 2021.

HOLOGIC, I. Aptima Combo 2® Assay (Panther System). **Hologic**, 2019b.

HJELMEVOLL, STIG OVE et al. A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* *porA* pseudogene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 5, p. 574–581, 2006.

HUMBERT, M. V.; CHRISTODOULIDES, M. Atypical, yet not infrequent, infections with neisseria species. **Pathogens**, v. 9, n. 1, 2020.

KOLAPPAN, S. et al. Structure of the *Neisseria meningitidis* type IV pilus. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–12, 2016.

LIGON, B. L. Albert Ludwig Sigmund Neisser: Discoverer of the cause of gonorrhea. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 336–341, 2005.

LUIJT, D. S. et al. Comparison of COBAS AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR, including confirmation with *gonorrhoeae*-specific 16S rRNA PCR, with traditional culture.

Journal of Clinical Microbiology, v. 43, n. 3, p. 1445–1447, 2005.

JAMORALIN, MANUEL C. et al. Genomic surveillance of *Neisseria gonorrhoeae* in the Philippines, 2013-2014. **Western Pacific surveillance and response journal: WPSAR**, v. 12, n. 1, p. 17–25, 2021.

MARIA, L.; COSTA, B. Estudo da susceptibilidade a antimicrobianos de *Neisseria gonorrhoeae* isolada de pacientes atendidos em centro referencial público para doenças sexualmente transmissíveis de belo horizonte **Faculdade de Medicina da Belo Horizonte-MG**. p. 1–112, 2013.

MAYOR, M. T.; ROETT, M. A.; UDUHIRI, K. A. Diagnosis and management of gonococcal infections. **American Family Physician**, v. 86, n. 10, p. 931–938, 2012.

MCSHEFFREY, G. Host Cellular Responses to *Neisseria gonorrhoeae*. **University of Toronto** p. 91, 2016.

MCSHEFFREY, G. G.; GRAY-OWEN, S. D. **Neisseria gonorrhoeae**. Elsevier Ltd, v. 3, 2014.

MEYER, T.; BUDER, S. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*: Current testing and future demands. **Pathogens**, v. 9, n. 2, p. 1–19, 2020.

NOVAIS, CAROLINE et al. Uma Inovação tecnológica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). [S.l.: s.n.], 2014. Disponível em: <www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/>. Acesso em: 19 jun. 2022.

ORTIZ, M.; SANTANDER, E.; LUGO, J. *Neisseria gonorrhoeae*: v. 38, n. 4, p. 512–522, 2021.

PENNA, G. O.; HAJJAR, L. A.; BRAZ, T. M. Gonorrhea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 451–464, 2000.

PCDT. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapeuticas para Atenção às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis**, n. 0014125063, p. 1–248, 2020.

PLANT, L. et al. Lipooligosaccharide structure contributes to multiple steps in the virulence of *Neisseria meningitidis*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1360–1367, 2006.

QUILLIN, S. J.; SEIFERT, H. S. *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 226–240, 2018.

RUSSELL, MICHAEL W.; GRAY-OWEN, Scott D.; JERSE, Ann E. Editorial: Immunity to *Neisseria gonorrhoeae*. *Frontiers in Immunology*. [S.l.]: **Frontiers Media S.A**, 2020.

RYAN, C. et al. BD ProbeTec ET assay for the diagnosis of gonorrhoea in a high-risk population: A protocol for replacing traditional microscopy and culture techniques. **Sexually Transmitted Infections**, v. 83, n. 3, p. 175–179, 2007.

SERRA-PLADEVALL, J. et al. Differences in *Neisseria gonorrhoeae* population structure and antimicrobial resistance pattern between men who have sex with men and heterosexuals. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 2, p. 379–385, 2017.

SHAUGHNESSY, J.; RAM, S.; RICE, P. A. Biology of the Gonococcus: Disease and Pathogenesis BT - *Neisseria gonorrhoeae*: Methods and Protocols. In: **CHRISTODOULIDES, M.** (Ed.). NY: Springer New York, p. 1–27. 2019.

SHIPITSYNA, E.; GUSCHIN, A.; MAXIMOVAANNA. **APMIS - 2008 - SHIPITSYNA - Comparison of microscopy culture and in-house PCR and NASBA assays for diagnosis of Neisseria.pdf**, 2018.

SILVA, R. C.; GOMES, G.; SILVA, D. A. Gonorreia E Sua Resistência a Antibióticos: Uma Revisão De Literatura Gonorrhea and Its Resistance To Antibiotics: **a Literature Review**. v. 29, p. 124–132, 2020.

SINGH, R. R.; PATEL, K. P. Chapter 4 Emulsion PCR: Techniques and Appl. **Clinical Applications of PCR, Methods in Molecular Biology**, v. 1392, p. 33–42, 2016.

TIAN et al. Evaluation of the Diagnostic Efficacy of Xpert CT/NG for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **BioMed Research International**, v. 2020, n. Ci, 2020.

TRICHES, R. H. C.; TRICHES, T. C.; ROJAS, P. F. B. Violência na gestação: prevalência e perfil do agressor. **Femina Febrasgo**, v. 46, n. 2, p. 115–123, 2018.

UNEMO, M. et al. Gonorrhoea. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, 2019a.

UNEMO, M. et al. Finnish new variant of chlamydia trachomatis escaping detection in the aptima combo 2 assay also present in Örebro county, sweden. **Eurosurveillance**, v. 24, n. 26, p. 0–4, 2019b.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st Century: Past, evolution, and future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 3, p. 587–613, 2014.

UNEMO, M.; NORLÉN, O.; FREDLUND, Hans. **APMIS**, v. 113, p. 410–419, 2005.

VENTER, J. M. E. et al. Comparison of an in-house real-time duplex PCR assay with commercial HOLOGIC® APTIMA assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in urine and extra-genital specimens. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–7, 2019.

VERMA, R. et al. Diagnostic implications of 16S ribosomal assay for gonorrhoea. **Sexually Transmitted Infections**, v. 86, n. 6, p. 461–464, 2010.

WHILEY, D. M.; TAPSALL, J. W.; SLOOTS, T. P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*: An ongoing challenge. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 1, p. 3–15, 2006.

LIU, D. (Ed.). **Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens** (1st ed.), 2011.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide for Relative Standard Curve and Comparative CT Experiments**. Disponível online: <http://appliedbiosystems.gene-quantification.info>, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION guidelines for the Treatment of *Neisseria gonorrhoeae*. 2016.