



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

Christinni Machado Venturi

**ABORDAGEM MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM TECIDO
PLACENTÁRIO HUMANO**

Florianópolis
2023

Christinni Machado Venturi

**ABORDAGEM MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM TECIDO
PLACENTÁRIO HUMANO**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Bazzo.

Coorientador: Me. Fernando Hartmann Barazzetti.

Florianópolis

2023

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

Venturi, Christinni Machado

Abordagem molecular para detecção de patógenos em tecido placentário humano / Christinni Machado Venturi ; orientadora, Maria Luiza Bazzo, coorientador, Fernando Hartmann Barazzetti, 2023.

75 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

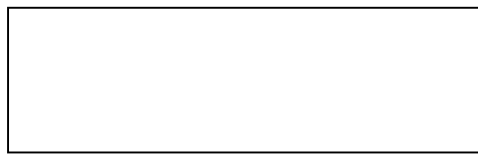
1. Farmácia. 2. Placenta. 3. Treponema pallidum. 4. SARS-CoV-2. 5. Streptococcus agalactiae. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Barazzetti, Fernando Hartmann. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Christinni Machado Venturi

**ABORDAGEM MOLECULAR PARA DETECÇÃO DE PATÓGENOS EM
TECIDO PLACENTÁRIO HUMANO**

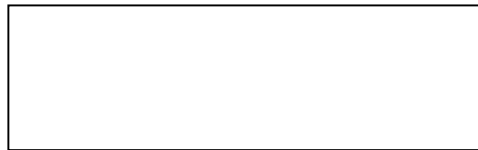
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 24 de novembro de 2023.



Coordenação do Curso

Banca examinadora



Prof.a Maria Luiza Bazzo, Dra.
Orientadora.

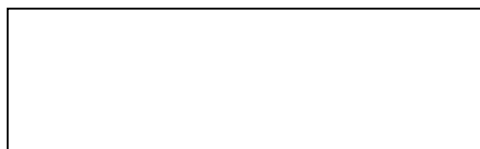


Fernando Hartmann Barazzetti, Me.
Coorientador.



Prof.a Jussara Kasuko Palmeiro, Dra.
Membro titular

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof.a Patricia Hermes Stoco, Dra.

Membro titular

Universidade Federal de Santa Catarina



Taiane Freitas Medeiros, Dra.

Membro suplente

Centro Universitário Estácio de Sá

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Rosilene, e à minha irmã, Clara, por me apoiarem acima de tudo e sempre acreditarem nos meus sonhos. Saber que vocês duas estão torcendo por mim e confiando nas minhas decisões me dá forças para continuar em frente. Amo vocês.

Às minhas amigas, Júlia Azevedo, Julia Pedrosa e Talita, que me ensinaram que família vai além do laço sanguíneo e que a definição de lar inclui vocês. Junto com o meu filho canino Theo, que independente do dia, vai estar me esperando com alegria e carinho em casa.

À minha orientado, Profa. Maria Luiza Bazzo, pela oportunidade de aprender biologia molecular e auxiliar em diversos projetos dentro do LBMMS, além de confiar o presente trabalho na bolsista que chegou na reunião com uma semana de antecedência. Ao meu coorientador, Fernando Hartmann Barazzetti, por toda a disponibilidade em me ajudar e parceria durante o trabalho.

Às minhas amigas de graduação, Júlia A., Julia Kinetz, Júlia Rozicki, Maria Eduarda, Maria Julia e Laís, por todas as noites estudando na BU e todas as conversas na fila do RU, sentirei saudades de viver a UFSC com vocês. Kiki, em especial a você, minha dupla desde o primeiro dia de aula e que, assim espero, continuará sendo durante toda a minha jornada.

Aos colegas do LBMMS, por cada “cafezão”, cada ensinamento trocado e cada riso compartilhado durante a execução das rodadas do AEQ. Em especial ao Marcos André Schörner e ao Henrique Borges da Silva Grisard pela paciência e auxílio durante o trabalho. À equipe do “covidão”, Jhonatan e Rafael, pela parceria em cada rotina de trabalho. E à Cida, por ter me ensinado tanto sobre coleta e profissionalismo.

À Maria Eduarda Hanoff pelos 10 anos de amizade e por sempre aceitar as minhas ideias de aventuras.

À todos os professores que me ajudaram nesses cinco anos e meio de graduação, e me guiaram dentro das Análises Clínicas e aos bioquímicos que tive o prazer de acompanhar durante os meus estágios e se tornaram modelo de profissionais a serem seguidos.

RESUMO

Placenta é um órgão transitório que funciona como sistema de transporte de substâncias da mãe para o feto. A placentação remodela a circulação sanguínea materna, havendo contato direto com a placenta, expondo o feto a possíveis patógenos maternos. As infecções congênitas são uma importante causa de morte em todo o mundo, e durante a pandemia causada por SARS-CoV-2, estudou-se a possibilidade de uma infecção viral congênita em virtude da considerável expressão gênica dos receptores e mediadores celulares para SARS-CoV-2 em várias regiões da placenta. Como a placenta forma uma barreira entre os compartimentos fetais e maternos durante a gravidez, o cordão umbilical é a provável via de infecção materno-fetal de *Treponema pallidum* (TP), ocorrendo cerca de 661 mil casos de sífilis congênita mundialmente. Outro patógeno cuja colonização pode predispor tanto a mãe, quanto o feto a potenciais efeitos adversos é *Streptococcus agalactiae* (GBS), sendo uma das principais causas de parto prematuro induzido mundialmente. Nesse cenário, o trabalho visou padronizar uma abordagem molecular para pesquisa de SARS-CoV-2, TP e GBS em amostras de tecido placentário. Para isso, foram analisadas 113 placentas provenientes de mulheres com infecção por SARS-CoV-2 no momento do parto. A extração do material genético do tecido placentário foi realizada utilizando kits comerciais enquanto a amplificação foi realizada por RT-qPCR utilizando o kit *Allplex™ SARS-CoV-2 Assay* e q-PCR utilizando o kit *Allplex™ Genital Ulcer Assay*, que pode detectar até sete patógenos causadores de úlceras genitais (Citomegalovírus, *Haemophilus ducreyi*, Herpes-vírus simples tipo 1, Herpes-vírus simples tipo 2, TP, Vírus varicela-zóster e *Chlamydia trachomatis* (L1-L3) - causadora de lymphogranuloma venereum) e por PCR convencional para o gene *cfb* de GBS. Seis amostras foram positivas para SARS-CoV-2 (5,66%); uma amostra positiva para *Haemophilus ducreyi* (0,91%); e nenhuma positiva para TP e GBS. Visto os resultados do presente estudo, pode-se inferir que, para a detecção de uma possível infecção materno-fetal por SARS-CoV-2 a placenta humana demonstra ser uma amostra biológica com um bom potencial para a pesquisa do patógeno. Mais estudos são necessários para avaliar a presença de TP no tecido placentário e correlacionar com a sorologia da gestante durante o primeiro e terceiro trimestre de gestação; bem como a presença de GBS na placenta com o resultado de *swab* vaginal de rastreio durante as 36^o e 37^a semanas de gestação.

Palavras-chave: Placenta, SARS-CoV-2, *Treponema pallidum*, *Streptococcus agalactiae*.

ABSTRACT

Placenta is a transitory organ functioning as a transport system for substances from mother to fetus. Placentation remodels maternal blood circulation, and exposes the fetus to possible maternal pathogens. Congenital infections are a major cause of death worldwide, and during the SARS-CoV-2 pandemic, many studies investigated the possibility of congenital viral infection due to considerable gene expression of the viral receptors and cellular mediators for SARS-CoV-2 in various regions of the transitory organ. Given that the placenta creates a barrier between fetal and maternal compartments during pregnancy, the umbilical cord is likely a route for maternal-fetal infection by *Treponema pallidum* (TP), with approximately 661.000 cases of congenital syphilis worldwide. Another pathogen that can predispose both mother and child to potential adverse effects is *Streptococcus agalactiae* (GBS), which is one of the main causes of induced premature labor worldwide. In this scenario, this study aimed to standardize the molecular approach to identify SARS-CoV-2, TP, and GBS in placental tissue samples. For that, 110 placentas of patients infected by SARS-CoV-2 at the time of birth were analyzed. Extraction of genetic material from placental tissue was carried out using commercial kits while amplification was performed by RT-qPCR using *Allplex™ SARS-COV-2 Assay* and qPCR using *Allplex™ Genital Ulcer Assay* kits, which can detect up to seven pathogens responsible for causing genital ulcers (Cytomegalovirus, *Haemophilus ducreyi*, Herpes simplex virus type 1, Herpes simplex virus type 2, TP, Varicella zoster virus and *Chlamydia trachomatis* - which causes lymphogranuloma venereum), and by conventional PCR for GBS *cfb* gene. Six samples were positive for SARS-CoV-2 (5,66%); one placenta was positive for *Haemophilus ducreyi* (0,91%); and GBS was not positive. Thus, it can be inferred that, for detection of a possible maternal-fetal infection by SARS-CoV-2 the human placenta proves to be a biological sample with good potential for identification of pathogens. More research needs to be done to assess the presence of TP in placental tissue and correlate with serology of the patient during the first and third trimester of pregnancy; as well as the presence of GBS given the result of swab screening during the 36th and 37th week of gestation.

Keywords: Placenta, SARS-CoV-2, *Treponema pallidum*, *Streptococcus agalactiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação de um corte sagital de um útero grávido de 4 semanas.	18
Figura 2. Representação de corte transversal de uma placenta a termo ¹	19
Figura 3. Espiroquetas identificadas como <i>T. pallidum</i> em cordão umbilical utilizando coloração de prata.	25
Figura 4. Estrutura DPO™, Pitchers e Catchers.	29
Figura 5. Esquema do ensaio de clivagem e extensão de oligonucleotídeos de marcação (TOCE™).	30
Figura 6. Foto de de placenta que veio acondicionado em frasco estéril.	34
Figura 7. Foto de um fragmento com cerca de 30 mg em microtubo de 1,5 mL.	35
Figura 8. Gel dos cinco controles positivos para <i>S. agalactiae</i>	40
Figura 9. Fluxograma da metodologia do projeto.	40
Figura 10. Foto representando um produto de extração com presença do sedimento.	42
Figura 11. Concentração de material genético recuperado com cada um dos três métodos de extração.	43
Figura 12. Comparação entre a lise de duas amostras.	44
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade de DNA das amostras.	45
Figura 14. Número de amostras que amplificaram pelo menos um alvo na PCR em tempo real utilizando o kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (Seegene®).	47
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose de PCR para o alvo cfb de <i>S. agalactiae</i>	50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Mediadores do vírus SARS-CoV-2 conforme localização placentária e função...23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as informações do kit <i>SARS-CoV-2 Assay</i> (Seegene®) e do kit <i>Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay</i> (Seegene®).....	38
Tabela 2. Comparação na concentração do material genético recuperado com o ki para RNA e com o protocolo In house.....	41
Tabela 3. Comparação dos parâmetros dos métodos de extração empregados.....	42
Tabela 4. Amostras detectadas para SARS-CoV-2 por PCR em tempo real	48
Tabela 5. Amostra 39 detectada para SARS-CoV-2 por PCR em tempo real	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2 - Enzima conversora da angiotensina 2

COVID-19 - Doença do Coronavírus 2019

DNA - Ácido desoxirribonucleico

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

DPP4 - Dipeptidil peptidase-4

DPO™ - Oligonucleotídeos de iniciação dupla, do inglês, *Dual Priming Oligonucleotides*

GBS - Estreptococos do grupo B, do inglês, *Group B Streptococcus*

IC - Controle interno

ISTs - Infecções Sexualmente Transmissíveis

LBMMS – Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real do inglês, *Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*

rcf - Força centrífuga relativa, do inglês, *Relative Centrifugal Force*

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa, do inglês, *Reverse Transcriptase Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*

RNA - Ácido ribonucleico

SARS-CoV-2 - Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave, do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th1 - Linfócito T helper 1, do inglês, *Lymphocytes T helper 1*

Th2 - Linfócito T helper 2, do inglês, *Lymphocytes T helper 2*

TOCE™ - Marcação de clivagem e extensão de oligonucleotídeos, do inglês, *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension*

TMPRSS - Serina Protease da Transmembrana 2

TP - *Treponema pallidum*

ZIKV - vírus da Zika

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca registrada

μ Micro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 PLACENTA	17
2.2 INTERAÇÃO MATERNO-FETAL	20
2.3 DIAGNÓSTICO EM TECIDO PLACENTÁRIO	21
2.4 SARS-CoV-2	21
2.5 <i>Treponema pallidum</i>	23
2.6 <i>Streptococcus agalactiae</i>	26
2.7 METODOLOGIAS MOLECULARES	27
2.7.1 Extração de material genético de tecido	27
2.7.2 Reação em cadeia da polimerase	28
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	34
5.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO	35
5.2.1 Preparação das amostras	35
5.2.2 Extração do RNA	35
5.2.2.1 <i>Análise estatística</i>	36
5.2.3 Extração do DNA	36
5.2.4 Quantificação do material genético por espectrofotometria	37
5.2.5 Integridade do material genético	37
5.3 DETECÇÃO DE SARS-COV-2	37
5.4 DETECÇÃO DE <i>Treponema pallidum</i>	38

5.5 DETECÇÃO DE <i>Streptococcus agalactiae</i>	39
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
6.1 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO	41
6.2 DETECÇÃO DE SARS-COV-2	47
6.3 DETECÇÃO DE <i>Treponema pallidum</i>	49
6.4 DETECÇÃO DE <i>Streptococcus Agalactiae</i>	50
7 CONCLUSÃO.....	52
8 PERSPECTIVAS.....	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO <i>IN HOUSE</i> PARA RNA	59
APÊNDICE A - TABELA DAS AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE ESTABILIZANTE. 60	
APÊNDICE B – TABELA COM RESULTADOS DE DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM TECIDO PLACENTÁRIO	61
APÊNDICE C – TABELA COM RESULTADOS DE DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 NOS <i>SWABS</i>.....	65
APÊNDICE D - TABELA COM OS RESULTADOS DE DETECÇÃO PARA <i>Treponema pallidum</i>.....	66
APÊNDICE E – FIGURAS COM OS RESULTADOS DE DETECÇÃO PARA <i>Streptococcus agalactiae</i>	71

1 INTRODUÇÃO

A placenta é um órgão materno fetal transitório constituído por uma porção fetal originada do saco coriônico e uma porção materna originada da decídua, e funciona como um sistema de transporte de substâncias da mãe para o feto e vice e versa, fazendo com que a placenta desempenhe um papel fundamental na saúde e bem-estar materno-fetal (Cindrova-Davies; Sferruzzi-Perri, 2022). Próximo ao 10º dia da gestação a circulação útero-placentária é estabelecida, sendo que a placentação remodela a circulação sanguínea da mãe e a placenta torna-se hemocorial, ou seja, haverá contato direto entre o sangue materno e a placenta, expondo o feto a nutrientes, mas também a possíveis patógenos presentes na circulação materna (Moore; Persaud, 2008; Roberts; Myatt, 2015).

Na prática clínica a placenta comumente não é tida como um instrumento de pesquisa e diagnóstico, no entanto, as infecções congênicas são uma importante causa de morte em todo o mundo, podendo ser explorada como instrumento de análise laboratorial placentária visando a identificação de patógenos (Costa, 2022). Durante a pandemia causada por SARS-CoV-2, estudou-se a possibilidade de que ocorresse infecção congênita pelo vírus em virtude da expressão dos receptores envolvidos na entrada viral na célula em vários compartimentos da placenta (Patel *et al.*, 2017).

Como a placenta humana forma a primeira barreira entre os compartimentos fetais e maternos durante a gravidez, o cordão umbilical é a provável via de infecção materno-fetal de alguns patógenos, como de *Treponema pallidum*, causador da sífilis, doença que pode ser congênita. Já a colonização vaginal materna predispõe tanto a mãe quanto o feto a potenciais efeitos adversos, sendo *Streptococcus agalactiae* um potencial patógeno invasivo na interface materno-fetal (Brokam *et al.*, 2021).

O presente trabalho apresenta a placenta como uma amostra biológica capaz de auxiliar no diagnóstico e compreensão de doenças congênicas. Considerando a riqueza e raridade do material coletado, foi feita a pesquisa de SARS-CoV-2, *Treponema pallidum* e *Streptococcus agalactiae*, microrganismos relacionados a importantes infecções que podem acometer o concepto. Este trabalho teve como objetivos padronizar o manejo e a testagem molecular de amostras placentárias, visando selecionar as melhores metodologias a serem executadas para a extração de ácidos nucleicos, e posterior pesquisa de SARS-CoV-2, *Treponema pallidum* e *Streptococcus agalactiae* pela metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

2 REVISÃO DA LITERATURA

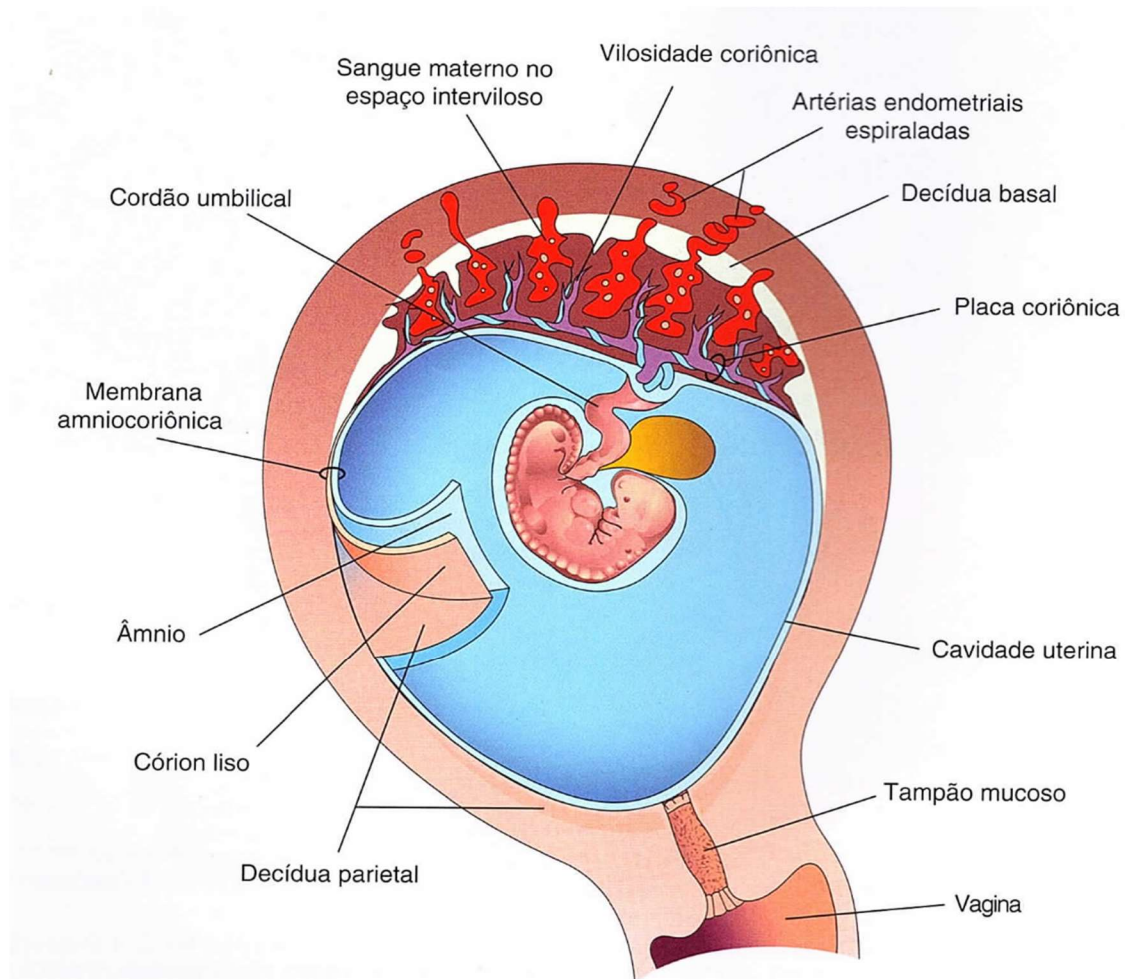
2.1 PLACENTA

A placenta é um órgão materno-fetal transitório constituído por uma porção fetal originada do saco coriônico, uma porção materna originada da decidua - endométrio gravídico, porção funcional do endométrio que se separa do útero após o parto (Moore; Persaud, 2008). Juntamente com o cordão umbilical, o órgão funciona como um sistema de transporte de substâncias da mãe para o feto e vice e versa. Por meio dessa comunicação, nutrientes, oxigênio, eletrólitos e anticorpos migram do sangue materno ao fetal (Costa, 2022). Enquanto isso, produtos de excreção e dióxido de carbono migram do sangue fetal ao materno (Moore; Persaud, 2008), fazendo com que a placenta desempenhe um papel fundamental na saúde e bem-estar materno-fetal (Cindrova-Davies; Sferruzzi-Perri, 2022).

O desenvolvimento da placenta ocorre concomitante ao do embrião, e logo após a fertilização o zigoto cliva-se nas trompas de falópio até originar a mórula. No útero, o próximo estágio de desenvolvimento é o blastocisto, formado por células externas denominadas trofoblastos, que originam a placenta e as membranas fetais; e internas, os embrioblastos, que originam o embrião (Roberts; Myatt, 2015). O processo de formação da placenta requer uma interação coordenada entre as linhagens celulares trofoblásticas e o endométrio materno visto que a formação da placenta inicia com a ligação do trofoectoderma polar do blastocisto ao epitélio endometrial, levando à diferenciação celular (Cindrova-Davies; Sferruzzi-Perri, 2022).

O trofoblasto se diferencia em duas camadas: a externa, chamada sinciciotrofoblasto, que é um tecido especializado responsável por invadir o tecido conjuntivo endometrial e implantar superficialmente o blastocisto, além de transportar gases, nutrientes e sintetizar hormônios peptídicos e esteroides que regulam os sistemas placentário, fetal e materno; e a camada interna, chamada de citotrofoblasto, que são células que permanecem não fundidas e são mitoticamente ativas (Roberts, Myatt, 2015; Moore, Persaud, 2008). Com o processo de penetração do sinciciotrofoblasto no endométrio ocorre a sua transformação em um tecido especializado chamado decidua. Quando o sinciciotrofoblasto primário recobre todo o saco gestacional, o estágio de implantação estará completo (Cindrova-Davies; Sferruzzi-Perri, 2022) (Figura 1).

Figura 1. Representação de um corte sagital de um útero grávido de 4 semanas.



Fonte: Adaptada de Moore e Persaud, 2008.

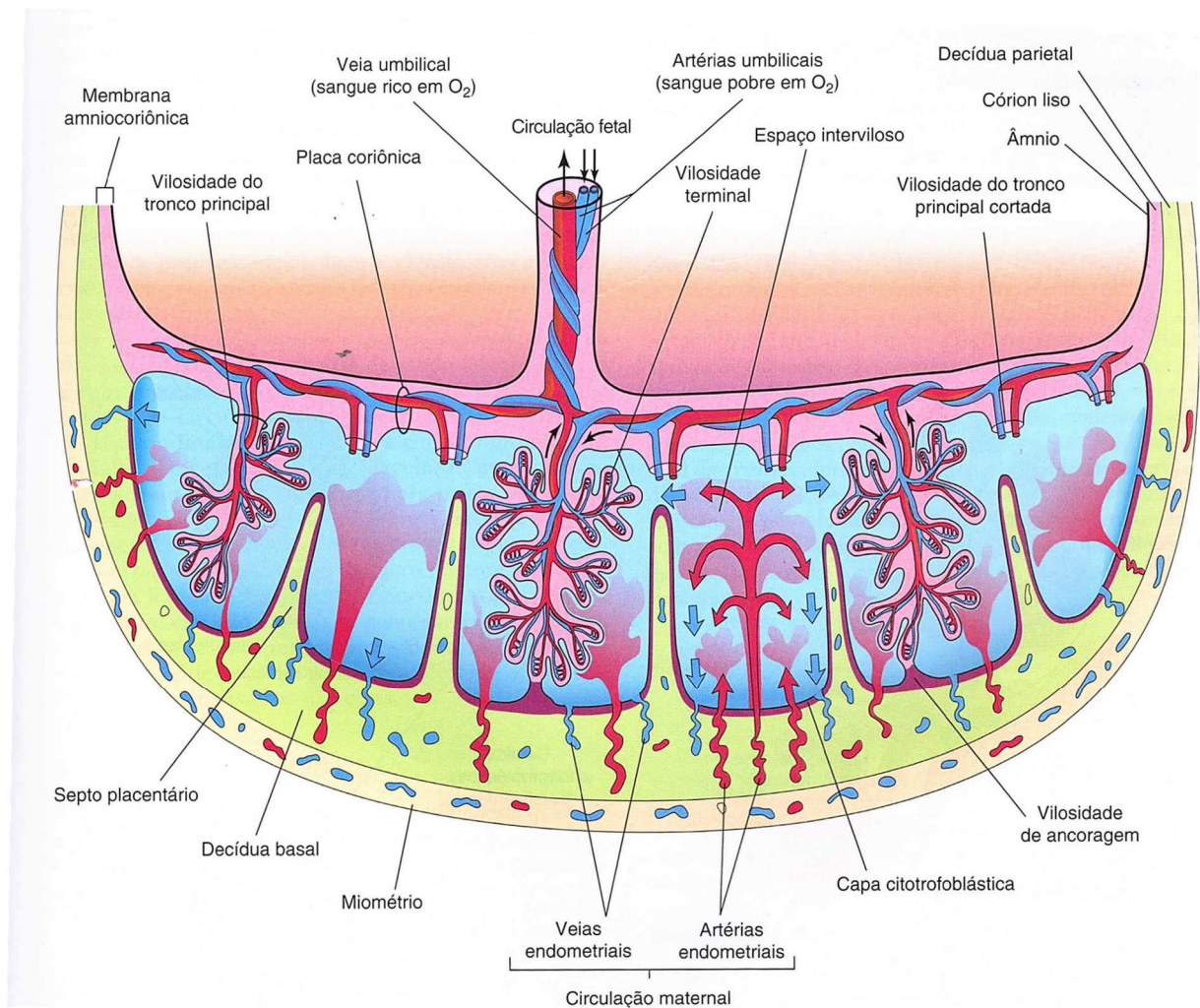
Com a erosão dos tecidos endometriais da decídua pelo sinciotrofoblasto, ocorre o aparecimento dos vacúolos os quais formam as lacunas, que são regiões preenchidas com o sangue materno, decorrentes dos vasos endometriais erodidos pelo sinciotrofoblasto. Lacunas adjacentes fundem-se e originam, aproximadamente no dia 10 da gestação, as redes lacunares. Por meio dessas redes lacunares, a circulação útero-placentária é estabelecida, dando origem aos espaços intervillares da placenta, onde o sangue oxigenado das artérias endometriais passa para as lacunas e o sangue pobre em oxigênio é removido pelas veias endometriais (Moore; Persaud, 2008; Roberts; Myatt, 2015).

Ao final da segunda semana, uma camada de sinciotrofoblasto com um núcleo de citotrofoblasto desloca-se no espaço lacunar, formando as vilosidades coriônicas primárias. Com a posterior ramificação das vilosidades e penetração no mesênquima, as vilosidades coriônicas passam a ser secundárias e recobrem todo o saco coriônico. As células mesenquimais diferenciam-se em capilares e células sanguíneas, que conectam-se aos vasos do cordão

umbilical e do embrião, originando as vilosidades terciárias (Moore; Persaud, 2008; Roberts; Myatt, 2015).

Os capilares vilosos, por sua vez, se fundem e formam redes arteriocapilares, que se conectam ao sistema cardiovascular do embrião. Dessa forma, ao fim da terceira semana, o oxigênio e nutrientes do sangue materno do espaço intervilloso se difunde as vilosidades terminais e penetram no sangue fetal, resultando nas trocas materno-fetal por meio de artérias e veias endometriais (Moore; Persaud, 2008) (Figura 2). Sendo assim, a circulação sanguínea da mãe está remodelada graças a placentação e a placenta torna-se hemocorial, ou seja, haverá contato direto entre o sangue materno e a placenta, expondo, o feto a possíveis patógenos presentes na circulação materna (Arora *et al.*, 2017).

Figura 2. Representação de corte transversal de uma placenta a termo¹.



Fonte: Adaptada de Moore e Persaud, 2008.

¹ Nota-se que as artérias umbilicais transportam sangue fetal pouco oxigenado (mostrado em azul) para a placenta e que a veia umbilical transporta sangue oxigenado (mostrado em vermelho) para o feto.

Com o crescimento do saco coriônico recoberto das vilosidades e das ramificações associadas à decídua, se origina uma região arboriforme chamada de córion viloso (Moore; Persaud, 2008). Dessa forma, a decídua, rica em células imunes e irrigada com o sangue materno, aparece como um ambiente que pode contribuir para a eliminação ou invasão do patógeno, dependendo dos fatores de virulência deste ou da resposta do hospedeiro (Brokaw *et al.*, 2021).

2.2 INTERAÇÃO MATERNO-FETAL

Algumas proteínas são transferidas por meio da placenta, como os anticorpos maternos, a exemplo da imunoglobulina G (IgG) que é o anticorpo responsável por conferir imunidade passiva ao feto e posteriormente ao recém-nascido. Desde o início do segundo trimestre gestacional, a concentração de IgG no sangue fetal aumenta, apesar de a maioria dos anticorpos serem adquiridos no terceiro trimestre. O IgG é transportado por meio do sinciciotrofoblasto pelo receptor Fc neonatal (FcRn - do inglês, *neonatal Fc receptor*) (Roberts; Myatt, 2015).

Para garantir que o sistema imune da mãe não rejeite o feto, ocorre uma mudança de imunidade materna, desde o início da gravidez, relacionada aos subgrupos dos linfócitos T CD4: a predominância passa do T *helper* 1 (Th1) para T *helper* 2 (Th2). O primeiro (Th1) é responsável por uma resposta eficaz contra patógenos intracelulares, como os vírus e bactérias, e o segundo (Th2) por secretar interleucinas relacionadas a diferenciação de linfócitos B. Sendo assim, durante a gravidez, ocorre uma predisposição significativa da mãe a infecções respiratórias virais com potenciais efeitos adversos para a mãe e para o neonato (Gesaka; Obimbo; Wanyoro, 2022).

Muitos microrganismos podem infectar a placenta por via transvaginal ascendente ou por via hematogênica devido a uma violação na integridade da placenta ou nas respostas imunes. As vias de infecção congênita incluem: (i) disseminação célula a célula, envolvendo células imunes maternas infectadas e trofoblastos placentários; (ii) transcitose de vírions por meio de receptores; (iii) microvasculatura endotelial materna irrigando trofoblastos endovasculares fetais e (iv) como infecção transvaginal ascendente (Gesaka; Obimbo; Wanyoro, 2022). Os principais patógenos associados à transmissão vertical são conhecidos pelo acrônimo “TORCH”, e incluem: *Toxoplasma gondii*, vírus causador da rubéola (gênero

Rubivirus, família *Togaviridae*), Citomegalovírus (CMV), vírus *Herpes Simplex* 1 e 2, *Treponema pallidum* (TP), e mais recentemente, vírus da Zika (ZIKV) (Arora *et al.*, 2017).

2.3 DIAGNÓSTICO EM TECIDO PLACENTÁRIO

Na prática clínica a placenta comumente não é tida como um instrumento de pesquisa e diagnóstico. Isso porque a placenta positiva para determinado patógeno não significa infecção fetal, sendo necessário diagnosticar a patologia no feto. No entanto, as infecções congênicas são uma importante causa de morte em todo o mundo, podendo ser explorada como instrumento de análise laboratorial visando a identificação de patógenos (Costa, 2022). A exemplo da análise microscópica da placenta na infecção por CMV, com as clássicas inclusões oculares de coruja e vilite crônica (Costa, 2022); da tríade histológica de achados em placentas de pacientes com sífilis congênita, que inclui as vilosidades aumentadas e hipercelulares, alterações vasculares fetais proliferativas e vilite (Genest *et al.*, 1996); além da visualização do agente etiológico da sífilis em campo escuro logo após a coleta de amostras de placenta e cordão umbilical, tendo uma sensibilidade de 74% a 86% (Brasil, 2006).

Atualmente no Brasil, o diagnóstico de ZIKV pode ser realizado utilizando fragmento de tecido placentário pelos laboratórios de referência da rede do Sistema Único de Saúde (SUS) pela metodologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcriptase reversa (RT-qPCR - do inglês *Reverse Transcriptase Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*) (Brasil, 2016). Ainda, dentro dos exames de rotina do pré-natal, se tem a pesquisa de sífilis a partir de teste rápido imunocromatográfico (pesquisa a presença de anticorpos anti-*T. pallidum*, ou seja, um teste treponêmico) e/ou VDRL (presença de anticorpos anticardiolipínico, não treponêmico), juntamente com teste rápido imunocromatográfico para detecção de HIV, sorologia para Hepatite B (HbsAg) e Toxoplasmose (IgM e IgG), e pesquisa de estreptococos do grupo B (Brasil, 2012).

2.4 SARS-CoV-2

Coronavírus é uma família de vírus com genoma de RNA senso positivo, envelopados e responsáveis por ser a segunda principal causa de resfriado comum, sendo raramente associados a doenças mais graves (OPAS, 2023). No entanto, o gênero *Beta-coronavírus* já foi associado a uma epidemia e uma pandemia, causadas respectivamente por Coronavírus da

Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV - do inglês, *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*) e Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV - do inglês, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*). Nesse gênero encontra-se também o novo coronavírus, denominado Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), identificado em dezembro de 2019 e responsável por causar a doença chamada de COVID-19 (do inglês - *Coronavirus Disease 2019*) (Gesaka; Obimbo; Wanyoro, 2022). O quadro causado pela infecção por SARS-CoV-2 reflete acometimento de múltiplos órgãos e sistemas, e sua transmissão ocorre principalmente por gotículas respiratórias infectadas, sendo as vias fecal-oral e transmissão vertical (possivelmente) vias secundárias (Gesaka; Obimbo; Wanyoro, 2022). Ainda em janeiro de 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou o surto do novo coronavírus como uma Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional, sendo que dois meses depois, em março, caracterizou a pandemia da COVID-19 (OPAS, 2023).

O receptor de SARS-CoV-2 presente na célula humana é a Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2), na qual a proteína de superfície viral *Spike* (S) liga-se, seguida pela fusão viral com a membrana celular, ocasionada pela clivagem da proteína S pela ação de duas vias possíveis: por meio de proteases do hospedeiro, chamadas (i) Serina Protease da Proteína Transmembrana 2 (TMPRSS2); e (ii) catepsinas B e L; sendo que a principal via utilizada para a clivagem da proteína S ocorre pela TMPRSS2, visto a sua maior taxa de sucesso de entrada viral na célula (Benetti *et al.*, 2020). Após a fusão com a membrana da célula hospedeira ocorre a liberação do RNA viral no meio intracelular, com consequente replicação, transcrição e tradução das proteínas estruturais do vírus, resultando na exocitose de novas partículas virais (Beyerstedt; Casaro; Rangel, 2021; Hoffmann *et al.*, 2020). Recentemente foi relatado que a proteína S interage com a enzima dipeptidil peptidase-4 (DDP4) após entrar nas vias aéreas, funcionando como um fator para o tropismo e virulência do vírus (Mota *et al.*, 2021).

Estudos realizados com placentas provenientes de mulheres infectadas por SARS-CoV-2 elucidaram a expressão gênica dos mediadores da entrada viral na célula em vários compartimentos da placenta, sendo que a ACE2 é expressa no órgão e está envolvida com a regulação fisiológica da pressão arterial (Patel *et al.*, 2017). A ACE2 placentária responde ativamente à infecção por SARS-CoV-2 e, posteriormente, isso resulta em uma retroalimentação negativa, que pode levar à desregulação do Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona (SRAA), resultando em pressão sanguínea materna elevada e vascularização placentária disfuncional. Como resultado, há comorbidades associadas à infecção na gravidez,

como a pré-eclâmpsia (Verma *et al.*, 2021). Ainda, a coexpressão DDP4 com TMPRSS2 e furina podem levar a um aumento na permissividade da placenta à entrada do vírus. Outro fator que pode contribuir para a permeabilidade viral da placenta é a lesão isquêmica sofrida durante a infecção por SARS-CoV-2 (Gesaka; Obimbo; Wanyoro, 2022).

Esses mediadores virais estão correlacionados com os compartimentos placentários conforme o quadro a seguir (Quadro 1):

Quadro 1. Mediadores do vírus SARS-CoV-2 conforme localização placentária e função.

Mediador	Localização na placenta	Função
ACE2	Sinciciotrofoblasto, trofoblasto extraviloso, citotrofoblasto, endotélio dos vasos sanguíneos vilosos, células da decídua e cordão umbilical. E nos neutrófilos e macrófagos maternos na região vilosa.	Receptor alvo do vírus.
TMPRSS2	Trofoblasto extraviloso, citotrofoblasto, sinciciotrofoblasto e células estromais vilosas.	Cliva a proteína S, permitindo a entrada do vírus na célula.
Catepsina L	Sinciciotrofoblasto, trofoblasto extraviloso e células decíduais.	Outra via de clivagem da proteína S.
Furina	Em todo o tecido placentário e nas células fetais.	Reduz a dependência de proteases para a entrada do vírus na célula.
DPP4	Sinciciotrofoblasto, trofoblasto extraviloso e citotrofoblasto.	Aumenta a infectividade viral.

Fonte: Adaptado de Gesaka; Obimbo; Wanyoro, 2022.

2.5 *Treponema pallidum*

A sífilis é uma das infecções sexualmente transmissíveis (IST) mais comuns no mundo e a situação é alarmante no Brasil e mundialmente. Estima-se que em 2020 ocorreram 7,1 milhões de novos casos de sífilis em pessoas de 15 a 49 anos no mundo (WHO, 2021). Dados publicados pela OMS, em 2016, mostram que havia aproximadamente 661 mil casos de sífilis congênita mundialmente, tendo como resultado mais de 200 mil natimortos e mortes neonatais. A sífilis é considerada a segunda principal causa de morte fetal evitável no mundo, precedida somente pela Malária (OPAS, 2019). Em 2021, segundo o Ministério da Saúde, o número de casos de sífilis adquirida no Brasil era 167.523 casos e de sífilis congênita em menores de 1 ano de idade eram 27.019 casos (Brasil, 2022c).

A transmissão de *T. pallidum* (TP), agente etiológico da sífilis, ocorre por meio do contato direto com uma lesão causada pela infecção durante o ato sexual oral, vaginal e/ou anal ou de maneira vertical, de mãe para filho. Essas lesões podem ser encontradas na região do

pênis, vagina, ânus, reto, lábios e boca (Brasil, 2019) e são ricas em TP, uma bactéria espiroqueta (Figura 4) com elevada capacidade infectiva, dotada de mecanismos biológicos de evasão à resposta imune. TP é um microrganismo fastidioso e de difícil cultivo, impossibilitando sua identificação por meio de cultura por meio de métodos utilizados convencionalmente. O diagnóstico de sífilis pode ser realizado utilizando métodos diretos, como a microscopia de campo escuro e testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT - do inglês, *Nucleic Acid Amplification Test*), ou métodos imunológicos treponêmicos e não treponêmicos (Brasil, 2021).

A infecção tem início após a inoculação de espiroquetas na mucosa ou na pele lesionada, sendo que a ligação da bactéria com as células hospedeiras e com a matriz extracelular é o primeiro passo para ocorrer a infecção. Quando no hospedeiro, as bactérias se multiplicam e se disseminam por meio dos vasos linfáticos e sanguíneos, retornando ao local de inoculação e formando um cancro duro, caracterizando a sífilis primária (Radolf *et al.*, 2016). Quando a sífilis não é tratada precocemente, o patógeno pode novamente se disseminar pela corrente sanguínea, podendo acarretar diversas manifestações clínicas, como exantema generalizado e linfadenopatia generalizada, caracterizando sífilis secundária, e após um período de latência clínica de 10 a 30 anos, se não houver tratamento, é possível que ocorram complicações mais severas no caso de sífilis terciária (Hook, 2017).

Com a disseminação hematogênica, TP pode alcançar a placenta e infectar o feto, sendo essa condição denominada de sífilis congênita. O quadro de sífilis congênita pode vir a causar perda fetal após o primeiro trimestre da gestação ou morte do feto ou neonato, além de complicações como baixo peso corpóreo do bebê ao nascer, nascimento prematuro e aborto (Bezerra *et al.*, 2019). A transmissão vertical ocorre em qualquer etapa do desenvolvimento da gestação, mas há uma maior probabilidade de ocorrer durante a sífilis materna primária (Lafond; Lukehart, 2006). O diagnóstico da sífilis congênita é dificultado pela transferência passiva de anticorpos maternos, por isso os testes treponêmicos têm pouca importância, no entanto a sorologia simultânea do soro da mãe e do bebê com testes não-treponêmicos tem muita importância quando a amostra do bebê apresenta reatividade de dois títulos superiores em relação à amostra materna (Brasil, 2006).

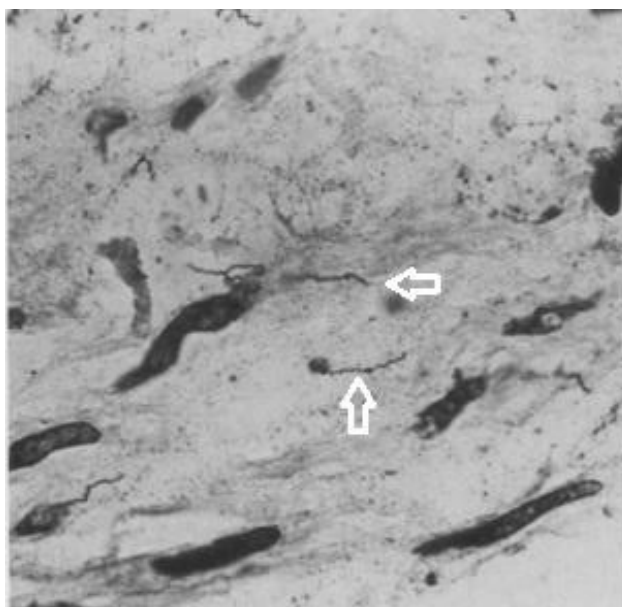
Para a escolha do tratamento de crianças com sífilis congênita leva-se em consideração o tratamento materno durante a gestação e dos títulos do teste não-treponêmico, tanto materno como da criança. Para crianças assintomáticas, administração de benzilpenicilina 50.000 UI/kg, intramuscular em dose única é eficaz. Quando a sífilis congênita é diagnosticada, a criança pode

ser tratada com benzilpenicilina procaína 50.000 UI/kg, por via intramuscular, 1x/dia por 10 dias; ou com benzilpenicilina potássica 50.000 UI/kg, por via intravenosa, de 12/12h (crianças com menos de 1 semana de vida) ou 8/8h (com mais de 1 semana de vida) por 10 dias. Caso o diagnóstico ocorra após 1 mês de idade, administra-se benzilpenicilina potássica 50.000 UI/kg, por via intravenosa, de 4/4h ou 6/6h por 10 dias (Brasil, 2022a).

Um estudo *in vitro* observou a aderência de TP com fibronectina, laminina, colágeno I e IV, ou seja, com todos os componentes estruturais presentes em membranas basais e matrizes extracelulares (Burgess *et al.*, 1994). A presença e distribuição dessas moléculas ocorre em diferentes regiões da placenta, como na decídua, no córion e no âmnio (Bryant-Greenwood, 1998).

Visto que a placenta humana forma a primeira barreira entre os compartimentos fetais e maternos, durante a gravidez, e que a ligação entre o feto e a região vilosa é o cordão umbilical, o torna a provável via por onde a espiroqueta infecta o feto, conforme o estudo conduzido por Schwartz e colaboradores (1995), os quais observaram que na análise de 25 amostras de cordão umbilical, 89% tiveram o agente etiológico TP detectado por coloração de prata e imunofluorescência (Figura 3).

Figura 3. Espiroquetas identificadas como *T. pallidum* em cordão umbilical utilizando coloração de prata.



Fonte: Schwartz *et al.*, 1995.

2.6 *Streptococcus agalactiae*

Também chamado de estreptococo do grupo B (GBS - do inglês *Group B Streptococcus*), *Streptococcus agalactiae* é uma bactéria gram-positiva, beta-hemolítica e em formato de cocos que se organizam em cadeias podendo colonizar o trato vaginal de forma assintomática. Entretanto, na gravidez, a colonização vaginal predispõe tanto a mãe quanto o feto a potenciais efeitos adversos, como aborto espontâneo, parto prematuro e natimorto, tornando o GBS um potencial patógeno invasivo na interface materno-fetal (Brokaw *et al.*, 2021). O feto e o recém-nascido são altamente suscetíveis à infecção pelo GBS, podendo levar a quadros de sepse e meningite, com sequelas no sistema nervoso central e na função pulmonar. Enquanto na mãe, a infecção por GBS pode ocasionar quadros sépticos e endometriose pós parto (Seale *et al.*, 2017b; Hall *et al.*, 2017), além de ser uma das principais causas de parto prematuro induzido mundialmente. Dados de um estudo internacional apontaram que dos 140 milhões de nascidos vivos em 2015, 20 milhões de neonatos foram expostos à infecção por GBS por via materna, além disso, ao menos 90.000 óbitos infantis (com até 3 meses de idade), 57.000 infecções fetais ou natimortos e 3,5 milhões de casos de parto prematuro foram atribuídos ao GBS (Seale *et al.*, 2017a). Uma revisão sistemática da literatura constatou que 0,38 mulheres a cada 1.000 gestações apresentam colonização invasiva pelo GBS, com sintomas como endocardite, hemorragia, pneumonia grave e morte materna (Hall *et al.*, 2017).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC - do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) preconiza a triagem universal de todas as gestantes entre as semanas 36 e 37 de gestação, a partir da coleta de dois *swabs*: um vaginal e outro retal, ou um único *swab*, sendo primeiro do sítio vaginal e depois retal, para cultura; como método alternativo ou adicional, o laboratório pode empregar metodologia molecular com uso de NAATs (ACOG, 2019). Em caso de detecção de GBS, a gestante recebe profilaxia antimicrobiana intravenosa intraparto, podendo ser utilizada preferencialmente penicilina (5.000.000U inicialmente e, após, 2.500.000U a cada 4 horas até o nascimento) ou ampicilina (2 g inicialmente e, após, 1 g a cada 4 horas até o nascimento) (CDC, 2022).

O genoma de GBS codifica adesinas e invasinas de superfície que interagem com o epitélio do hospedeiro, promovendo a infecção. Algumas dessas proteínas, como a BspA, BspB e CEACAM 1 e 5, estão presentes no trato genital feminino inferior e no útero, promovendo a adesão cervicovagial da bactéria. Quando aderida, a bactéria promove a perda da função da

barreira epitelial vaginal usando dessas proteínas para interagir com as células e estimular a esfoliação vaginal (Brokaw *et al.*, 2021).

A ascensão de GBS no trato vaginal exige uma interação transitória com o colo do útero, o qual é protegido pelo tampão muco cervical. O tampão funciona como barreira entre o colo do útero e o trato genital inferior, além de ser composto por substâncias antimicrobianas. No entanto, alterações podem ser induzidas pela microbiota vaginal disbiótica, resultando em infecções uterinas que podem induzir o parto prematuro (Brokaw *et al.*, 2021). Após atravessar o colo do útero, o patógeno encontra a decídua materna e as membranas corioamnióticas, onde consegue trafegar para o líquido amniótico e se adaptar ao novo ambiente. Por meio de alterações transcricionais, o estreptococo remodela seu metabolismo de aminoácidos e carboidratos, provendo suas necessidades nutricionais e possibilitando a infecção e colonização do feto (Brokaw *et al.*, 2021).

2.7 METODOLOGIAS MOLECULARES

2.7.1 Extração de material genético de tecido

A extração e purificação de ácidos nucleicos de patógenos (bactérias, vírus, fungos, tecidos animais e vegetais) ou de amostras clínicas, são etapas críticas para obter alta eficiência de amplificação na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction*), um dos métodos do procedimento NAATs. A extração inclui dois procedimentos básicos: lise celular e purificação do material genético. Após a lise das células presentes na amostra com adição de um reagente que provoca a desnaturação proteica, o material genético (DNA/RNA) deve ser isolado das proteínas e dos restos celulares por adição de um reagente com pH igual ou superior a 7,0 - ocorrendo a separação em fase orgânica e fase aquosa (a qual está presente o material genético) (Sambroock; Russell, 2001). Essa purificação também pode ocorrer por coluna de sílica ou beads magnéticas. O ácido nucleico é precipitado e ressuspenso em água livre de DNase/RNase ou solução-tampão padronizada para cada caso. Os produtos de extração podem ser submetidos a processos de concentração, a fim de se obter melhores rendimentos (Oliveira *et al.*, 2007).

Uma etapa anterior à lise deve ser empregada para amostras de tecido: a digestão. O processo envolve a fragmentação e digestão enzimática das proteínas do tecido. Para a fragmentação, pode-se utilizar processos manuais, como cortar o tecido com bisturi e macerar,

ou submeter a congelamento em nitrogênio líquido e pulverização com bastão. Para digestão, adiciona-se o tecido em um tubo com tampão de digestão (contendo proteína de digestão) e se incuba em temperatura próxima a 50°C (para atividade ótima da proteína) até que a amostra apresente aspecto viscoso (Sambroock; Russell, 2001; Oliveira *et al.*, 2007). Existem diversos protocolos disponíveis para auxiliar na extração do material genético (cada protocolo pode variar dependendo da amostra empregada e do objetivo de pesquisa) com opções tanto comerciais como *in house*, desenvolvidos e padronizados conforme cada laboratório (Silva, 2017).

A extração pode ser avaliada quanto a concentração e pureza por meio da análise de absorvância (A) em espectrofotometria. O material genético absorve luz no comprimento de onda de 260 nm e as proteínas em 280 nm. Portanto, a relação de A_{260}/A_{280} é um dos parâmetros para avaliar a qualidade do material genético extraído. Esta relação quando entre 1,8 e 2,0 indica boa pureza, sendo que valores inferiores a 1,8 indicam uma possível contaminação com proteínas (Sambroock; Russell, 2001; Oliveira *et al.*, 2007). Reagentes comuns na etapa de extração absorvem luz no comprimento de 230 nm, como isotiocianato de guanidina e fenol. Portanto a relação A_{260}/A_{230} é um parâmetro secundário para avaliar a pureza do produto de extração. Valores inferiores a 2,0 indicam a presença desses contaminantes orgânicos (ThermoFisher, 2023).

2.7.2 Reação em cadeia da polimerase

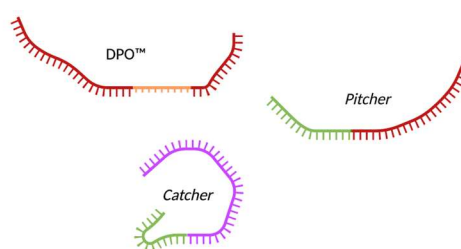
O desenvolvimento da técnica de PCR ampliou perspectivas no diagnóstico de doenças infecciosas, medicina forense, testes de identificação genética e controle de qualidade industrial. O princípio do método possibilita amplificar moléculas de DNA e cDNA (DNA complementar), de forma rápida e específica, a partir de quantidades mínimas de amostras (Zaha; Ferreira; Passaglia, 2012; Oliveira *et al.*, 2007).

A PCR permite a amplificação de segmentos definidos de DNA/cDNA, chamados de sequência-alvo. Quando a amostra de trabalho for RNA, ocorre a transcrição reversa de RNA em cDNA pela enzima transcriptase reversa, e a partir das moléculas complementares é realizada a PCR (Zaha; Ferreira; Passaglia, 2012). As reações contêm a sequência-alvo, uma DNA-polimerase, dois oligonucleotídeos iniciadores, desoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), tampão para a reação e cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (Sambroock; Russell, 2001). Um microtubo (livre de DNase e RNase) com todos os componentes da reação é colocado em um

termociclador, um equipamento que permite o aquecimento e resfriamento rápidos (de forma controlada e precisa) da amostra e programado para fazer os ciclos de temperaturas em tempos pré-estabelecidos, normalmente incluindo as etapas de desnaturação do DNA-alvo (~94°C), pareamento do iniciador à sequência alvo (45°C-65°C), a depender da sequência do iniciador e extensão (68°C-72°C) de uma nova fita de DNA, quantificando o número de cópias do produto a cada ciclo do protocolo de ciclagem (Zaha; Ferreira; Passaglia, 2012).

Um avanço importante na técnica de PCR foi o advento de metodologias que permitiram acompanhar a amplificação do DNA/cDNA durante todo o processo de ciclagem, com a presença de um método capaz de detectar o acúmulo dos produtos da transcrição e um termociclador capaz de registrar os resultados a cada ciclo (Zaha; Ferreira; Passaglia, 2012). Atualmente, a PCR em tempo real (qPCR - do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) é considerada padrão ouro para o diagnóstico molecular clínico de SARS-CoV-2, segundo a Agência Nacional de Saúde Suplementar (Brasil, 2022b). Devido à crescente demanda de técnicas moleculares, novas tecnologias vêm surgindo no mercado visando aumentar a sensibilidade e eficiência das reações (Chun, 2012). Como exemplo disso, foi desenvolvida a tecnologia MuDT™, que possibilita a detecção de múltiplos alvos em um único leitor sem análise de curva de dissociação. Esta plataforma é combinada com as tecnologias DPO™ e TOCE™. A tecnologia TOCE™ possui três componentes chaves: pares de iniciadores DPO™, Pitchers e Catchers (Lee, 2012) (Figura 4).

Figura 4. Estrutura DPO™, Pitchers e Catchers.



Fonte: Adaptado de Seegene, 2023.

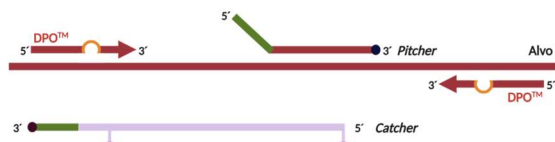
Os pares de iniciadores DPO™ aumentam a especificidade da reação com a dupla ligação ao alvo, sendo compostos por duas porções iniciadoras: a porção 5', chamada de estabilizadora, sendo responsável pelo pareamento estável na fita alvo; e a porção 3', chamada de determinante, e responsável pela extensão alvo específico. A ligação inicial ocorre na porção estabilizadora, enquanto a extensão da fita complementar é controlada pelo pareamento da porção determinante. Entre elas, há a porção *linker*, que funciona como um obstáculo de “mau

pareamento”, ou seja, caso uma das porções não esteja pareada, o *linker* impede a extensão. Assim, ambas as porções precisam ligar-se ao DNA alvo, como estratégia de evitar a amplificação de alvos não-específicos (Chun *et al*, 2007). O *pitcher* é um oligonucleotídeo de fita simples composto por uma porção de marcação complementar ao *catcher* e uma porção que pareia especificamente com a região alvo de interesse. Já o *catcher* é um molde artificial independente do sítio-alvo duplamente marcado por um repórter fluorescente e um *quencher*, que é uma substância responsável por absorver a fluorescência, cuja conformação permite a proximidade de ambas as porções (Lee, 2012).

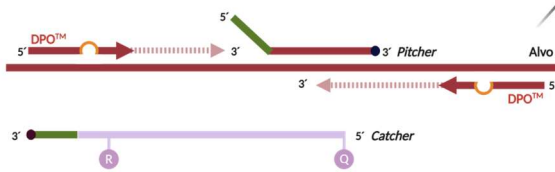
A reação inicia com o pareamento dos iniciadores DPO™ senso e antissenso, e pareamento do *pitcher* ao alvo, seguido da extensão pela enzima Taq DNA polimerase - que pela sua atividade 5'-nuclease - cliva o *pitcher*, liberando a porção de marcação. Esta porção se hibridiza ao *catcher*, funcionando como iniciador do *catcher*, induz a sua extensão e leva à criação do *duplex catcher*, causando o distanciamento entre o fluoróforo e o *quencher* (uma vez que está em sua conformação linear), resultando na geração de um sinal fluorescente (Lee, 2012) (Figura 5). O C(t) (do inglês, *threshold cycle*) é o número de ciclos necessários para amplificar o alvo, ou seja, o ponto de intersecção entre a curva sigmoideal da fluorescência com a linha limite (Penney *et al.*, 2022).

Figura 5. Esquema do ensaio de clivagem e extensão de oligonucleotídeos de marcação (TOCE™).

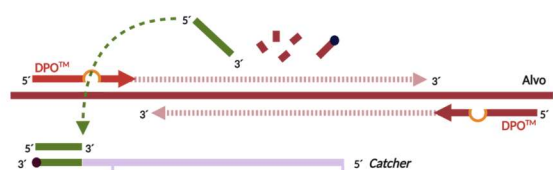
1. Anelamento



2. Extensão de Iniciadores



3. Clivagem do Pitcher e anelamento da porção marcadora no Catcher



4. Extensão da porção marcadora e geração de sinal luminoso



Fonte: Adaptado do Lee, 2012.

Como *catchers* têm diferentes perfis de temperatura de melting (T_m - do inglês *melting temperature*), a intensidade dos sinais de fluorescência dos alvos pode ser verificada controlando as temperaturas de detecção pela tecnologia de análise de dados MuDT™ (Seegene®), permitindo com que os alvos sejam distinguidos uns dos outros sem a análise da curva de dissociação e possibilitando a detecção e quantificação simultânea de múltiplos patógenos (Lee *et al*, 2014). Os perfis de T_m representam a temperatura em que 50% do DNA está na conformação de fita dupla e 50% em fita simples. Por esta razão, distinguem-se pelas diferentes sequências e quantidades de nucleotídeos que apresentam e pela porcentagem de bases nitrogenadas citosina e guanina na estrutura - visto que interagem por ligações triplas de hidrogênio, necessitando de maior energia para se romperem (Zaha; Ferreira; Passaglia, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

Na prática clínica, a placenta humana normalmente não é utilizada como um instrumento de pesquisa e diagnóstico e é descartada logo após o parto. No entanto, revisar seu aspecto geral e realizar uma análise morfológica e molecular pode auxiliar na compreensão de complicações materno-fetais e neonatais. Durante o início da pandemia por SARS-CoV-2, pouco se sabia do impacto da infecção materna sobre a saúde fetal e se o vírus passaria pela placenta infectando o embrião ou o feto. No meio do cenário pandêmico, ainda coberto de dúvidas, as placentas deste estudo foram coletadas para se fazer uma análise morfológica por estudo anatomopatológico (macro e micro anatomia) e detecção de SARS-CoV-2 por biologia molecular. Inicialmente, o estudo foi pensado para investigar apenas a presença de material genético de SARS-CoV-2. Posteriormente, considerando a riqueza e raridade do material coletado, foi expandido para incluir a pesquisa de *Treponema pallidum* e GBS, microrganismos relacionados à importantes infecções que podem acometer o concepto. O presente estudo pretendeu avaliar a melhor abordagem para utilizar a placenta como uma amostra biológica capaz de auxiliar no diagnóstico de possíveis infecções congênicas (transmissão vertical), justificando a necessidade em padronizar o manejo do tecido.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar uma abordagem molecular para pesquisa e diagnóstico de patógenos em amostras de tecido placentário humano no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (LBMMS/CCS/UFSC).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar os melhores métodos de extração para RNA do tecido placentário.
- Avaliar um método de extração comercial para DNA do tecido placentário.
- Pesquisar a presença de material genético de SARS-CoV-2, *Treponema pallidum* e *Streptococcus agalactiae* em amostra de tecido placentário.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado no LBMMS/CCS/UFSC localizado no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC/EBSERH). Ao todo, 113 fragmentos de placentas acondicionadas em frascos de 50mL estéreis encaminhadas por pesquisadores do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes-HUCAM, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), foram utilizadas neste estudo, das quais 27 contêm um agente estabilizador de RNA (RNAlater). Essas amostras foram coletadas de gestantes comprovadamente infectadas por SARS-CoV-2 e com quadros de COVID-19 grave, da região metropolitana de Vitória - ES, entre agosto de 2020 e março de 2021 e são oriundas do projeto intitulado “Desfechos perinatais e avaliação placentária quanto a presença do vírus em gestantes infectadas pelo SARS-CoV-2” aprovado em comitê de ética sob número CAAE: 36083220.6.0000.5071 e transportadas ao LBMMS em gelo seco. Todas as gestantes concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras foram enviadas para o LBMMS congeladas e transportadas em gelo seco por empresa especializada em transporte de amostras biológicas. Após o recebimento as amostras foram desvinculadas de qualquer identificação e armazenadas em ultrafreezer (a menos 80°C) até o processo de extração.

Figura 6. Foto de fragmento de placenta que veio acondicionado em frasco estéril.



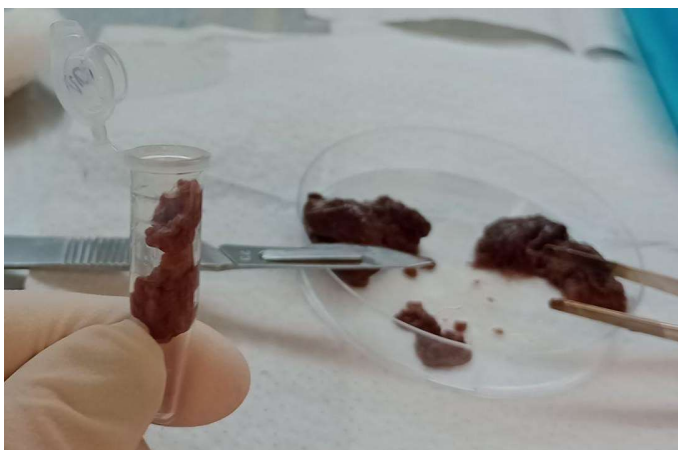
Fonte: Autora.

5.2 EXTRAÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

5.2.1 Preparação das amostras

Para o processo de descongelamento, as placentas foram transferidas do ultrafreezer para geladeira (2°C - 8°C) por 12 horas. Posteriormente foram seccionadas em 3 fragmentos de cerca de 30 mg de tecido, com auxílio de bisturi e em cabine de segurança biológica nível II. Após seccionadas, elas foram transferidas para dois tubos cônicos de 15 mL e para um microtubo de 1,5 mL (Figura 7). As regiões de secção foram preferencialmente selecionadas próxima aos vasos placentários, no entanto devido ao estado do fragmento de tecido não foi possível identificar tal região em todas as amostras.

Figura 7. Foto de um fragmento com cerca de 30 mg em microtubo de 1,5 mL.



Fonte: Autora.

5.2.2 Extração do RNA

Utilizando a amostra colocada nos tubos cônicos de 15 mL, foi realizada a extração de RNA por meio de dois protocolos: 1) por método *In house* conforme Bratnagar e colaboradores (2012) (Anexo A); e 2) com o kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen™), conforme as instruções do fabricante. Na etapa de precipitação do material genético com etanol 70% dos dois protocolos, foi adicionado 10 µL de controle interno Seegene® (IC), um alvo exógeno utilizado para verificar a ausência de inibidores de PCR. As amostras extraídas utilizando o kit comercial passaram por duas eluições- após a primeira eluição as colunas foram adicionadas em novo microtubo de 1,5 mL e adicionado 60 µL de tampão de eluição. Etapa visando diminuir

a quantidade de inibidores na reação de RT-qPCR, visto a proporção maior de material genético humano quando comparado ao dos patógenos possivelmente presentes, bem como a presença de sangue na amostra. Desta forma, foram avaliados os resultados de duas eluições de uma mesma coluna, resultando em dois produtos de extração por amostra. O RNA extraído foi mantido em ultrafreezer (-80°C) até a realização da RT-qPCR.

Ao todo, cinco amostras foram extraídas com o protocolo *In house*, sendo que três amostras tiveram dois (2) fragmentos de regiões distintas do tecido processados; e 106 amostras foram extraídas com o kit comercial. Os testes iniciais feitos com o protocolo *In house* incluíram a extração de três amostras previamente contaminadas com material genético e amostra primária proveniente de coleta de nasofaringe em Tampão Fosfato-Salino (PBS do inglês *Phosphate Bufferd Saline*) com C(t)s para SARS-CoV-2 já conhecidos: gene E com C(t) 26,96, gene RdRP 22,40 e gene N 25,95, para confirmar se haveria amplificação.

Não fazia parte do desenho experimental da metodologia do projeto, no entanto foi feita uma extração de *swabs* das placentas 37-48 com o kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN™).

5.2.2.1 Análise estatística

Para realizar as análises estatísticas comparando as duas metodologias de extração para RNA foi utilizado o teste de Distribuição F de Fisher-Snedecor, visto que o número de amostras submetidas aos dois métodos não é igual, no programa *GraphPad Prism*®.

5.2.3 Extração do DNA

A extração de DNA das 110 amostras foi realizada utilizando a amostra do microtubo de 1,5 mL com o kit *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™), conforme as instruções do fabricante. Após a extração, o material genético foi amplificado por qPCR utilizando o kit *Allplex™ Genital Ulcer Assay* (Seegene®).

Todas as amostras passaram por duas eluições, visando diminuir a quantidade de inibidores na reação de PCR. Desta forma, foram avaliados os resultados de duas eluições de uma mesma coluna, resultando em dois produtos de extração por amostra. O DNA extraído foi mantido em ultrafreezer (-80°C) até a realização da PCR.

Para o controle positivo na amplificação para GBS, cinco microtubos de 1,5 mL foram preparados com uma suspensão bacteriana em PBS estéril a partir do cultivo de *S. agalactiae* em meio ágar sangue. Quatro amostras foram extraídas utilizando o kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega®) e o quinto microtubo foi extraído por fervura: a suspensão bacteriana foi fervida a 100°C por 15 minutos, centrifugada a 21.000 rcf por um minuto, e o sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi alíquotado e armazenado a -20 °C (Alves, 2018).

5.2.4 Quantificação do material genético por espectrofotometria

A quantificação de ácidos nucleicos dos produtos de extração foi realizada no equipamento *NanoVue Plus™* (GE Healthcare), para comparar a eficiência e pureza do método comercial com o protocolo *In house* empregado para extração de RNA e avaliar a quantidade de material recuperado em cada eluição, para ambas as extrações. Bem como avaliar os parâmetros A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} para a extração de DNA. Além da quantificação ser um parâmetro para avaliar a possibilidade ou não de inibição da PCR (por excesso de material genético), também auxiliou nas diluições utilizando água livre de nuclease, feitas para executar as técnicas de PCR empregadas.

5.2.5 Integridade do material genético

A integridade do material genético é um parâmetro importante para correlacionar com a amplificação ou não dos alvos. Para avaliar a integridade dos produtos de extração, foi realizada uma corrida eletroforética de 30-40 min a 100V com 10 µL de material genético de 28 amostras de extração de RNA e 14 de DNA em gel de agarose 1,5%, selecionadas de forma aleatória. Os géis foram corados com brometo de etídio. Os produtos de PCR foram visualizados no transiluminador ImageQuant™ LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

5.3 DETECÇÃO DE SARS-COV-2

Para a detecção do SARS-CoV-2, utilizamos o material genético de 106 amostras previamente extraídas e detalhadas na seção 5.2. Utilizamos a técnica de RT-qPCR, executada com o kit comercial *Allplex™ SARS-CoV-2 Assay* da Seegene®, que permite a detecção dos genes virais E, N e RdRP do SARS-CoV-2, além de um controle interno (IC) exógeno

adicionado durante a etapa de purificação do protocolo de extração. É importante destacar que, uma vez que o IC não requer a lise celular, sua amplificação não é suficiente para confirmar a efetiva digestão e lise do tecido durante o processo. O IC tem como finalidade servir como um controle relativo ao sucesso da reação de RT-qPCR, como discutido por Rodrigues (2022).

Assim, para validar a eficácia da extração, realizamos a reação de RT-qPCR em duplicata, utilizando o kit mencionado anteriormente, bem como o kit *Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay* (Seegene®), que amplifica tanto o IC endógeno quanto o IC exógeno (um alvo humano) e os patógenos SARS-CoV-2, vírus sincicial respiratório (RSV- do inglês *Respiratory Syncytial Virus*), *Influenza A e B*.

Ambos os MasterMix foram preparados conforme as instruções do fabricante. A técnica amplifica os genes específicos associados a cada patógeno de interesse. As reações foram realizadas utilizando o termociclador em tempo real *CFX96™ Real-time PCR System* (Bio-Rad®), seguindo os protocolos recomendados pelo fabricante dos kits de amplificação. Os resultados foram subsequentemente analisados no programa *Seegene Viewer* (Seegene®).

Nos produtos de extração dos *swabs* coletados, a reação foi feita utilizando o kit *Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay* (Seegene®).

Tabela 1. Comparação entre as informações do kit SARS-CoV-2 Assay (Seegene®) e do kit Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay (Seegene®).

Parâmetros	Allplex™ SARS-CoV-2 Assay	Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV Assay
Especificidade	96,70% (95% CI: 90,67% a 99,31%)	97,79% (95% CI: 94,44% a 99,39%)
Sensibilidade	100% (95% CI: 96,23% a 100,00%)	97,44% (95% CI: 93,57% a 99,30%)
Límite de detecção do kit	1.000 equivalentes de genoma viral/mL	TCID 50/MI = 0,028
Ponto de corte do Ct	≤ 40 = DETECTADO (+)	≤ 40 = DETECTADO (+)
Inibição por sangue	2% (v/v)	2% (v/v)

Fonte: Adaptado de Seegene, 2023.

5.4 DETECÇÃO DE *Treponema pallidum*

Para detecção de *Treponema pallidum*, utilizamos o DNA de 110 amostras previamente extraídas, conforme detalhado na seção 5.2. Realizamos a qPCR com o kit comercial *Allplex™ Genital Ulcer Assay* (Seegene®), que detecta sete patógenos associados à úlcera genital, sendo eles: Citomegalovírus, *Haemophilus ducreyi*, Herpes-vírus simples tipo 1, Herpes-vírus simples tipo 2, Vírus varicela-zóster, *Treponema pallidum* e *Chlamydia trachomatis* (L1 – L3) - causadoras de lymphogranuloma venereum. A técnica amplificou os genes específicos

relacionados a cada patógeno, além de amplificar o IC endógeno que valida tanto a reação quanto o processo de extração.

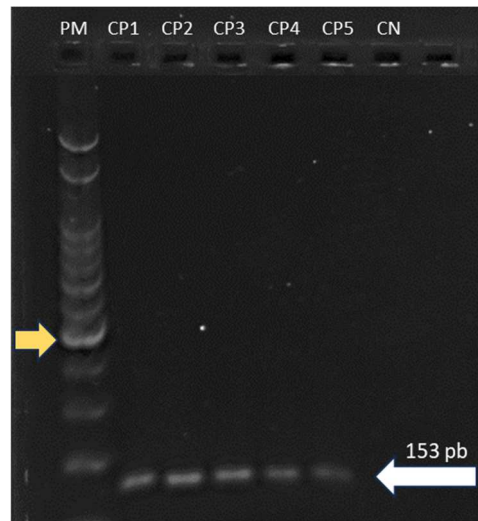
O MasterMix foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. As reações ocorreram utilizando o termociclador em tempo real *CFX96™ Real-time PCR System* (Bio-Rad®), seguindo o protocolo fornecido no kit de PCR pelo fabricante. Posteriormente, os resultados foram analisados no programa *Seegene Viewer* (Seegene®).

5.5 DETECÇÃO DE *Streptococcus agalactiae*

Para a detecção de *Streptococcus agalactiae*, utilizamos o DNA de 108 amostras previamente extraídas conforme descrito no item 5.2. Foi feita a pesquisa do gene *cfb*, que codifica uma proteína extracelular responsável pelo fator CAMP, caracterizando-se como uma região conservada bem conhecida em GBS (Alves, 2018). No procedimento, utilizamos um protocolo *In house* adaptado e padronizado pelo grupo de pesquisa do LBMMS para o MasterMix utilizando o kit GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega®): 1 X solução tampão, 2 mM de MgCl₂, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase, 0,3 µM de cada iniciador e água livre de nuclease para um volume total de 20 µL. Junto a ele, 5 µL de ácido nucleico de cada amostra foram adicionados para completar 25 µL em cada reação. Para assegurar a amplificação da PCR, cada amostra foi avaliada individualmente quanto à concentração de DNA, expressa em ng/µL, conforme descrito na seção 5.2.4. Essa etapa foi essencial para garantir que a quantidade máxima de DNA em cada reação não excedesse 200 ng, evitando potenciais inibições devido a excesso de material genético e determinando a necessidade de diluição, se aplicável. As amostras estavam com concentrações entre 20ng e 200ng de DNA para realizar a reação.

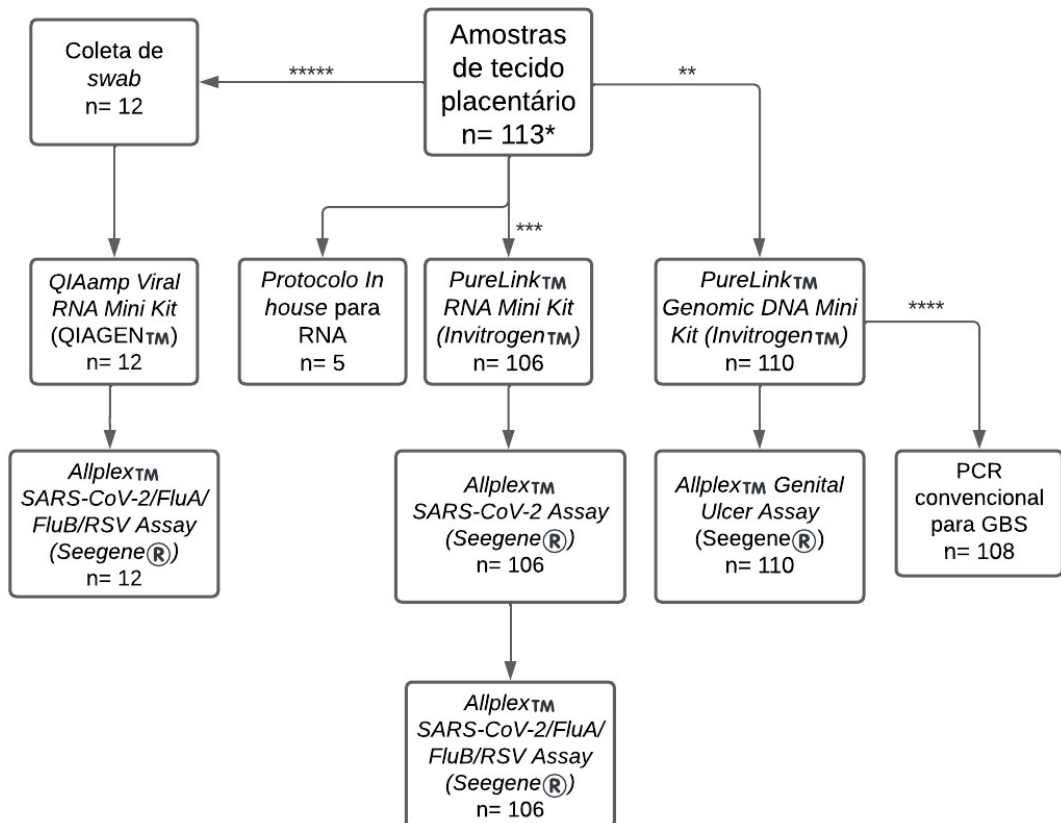
As reações de PCR foram conduzidas no termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad®) seguindo o protocolo de ciclagem descrito por Schörner e colaboradores (2014). O produto resultante da PCR, com um tamanho de 153 pares de bases (pb), foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em 1X de tampão TBE (tris/borato/EDTA) e corado com 1 µL de brometo de etídio. Os produtos de PCR foram visualizados no transiluminador *ImageQuant™ LAS 500* (GE Healthcare Bio-Sciences AB) e comparados com os controles positivos, como ilustrado na Figura 8, obtidos conforme detalhado na seção 5.2.3.

Figura 8. Gel dos cinco controles positivos para *Streptococcus agalactiae*.



Gel para validar os controles positivos de *Streptococcus agalactiae*, com bandas em 153 pb, para utilizar nas reações de PCR convencional de GBS. PM: padrão de tamanho molecular de 100 pares de base. A seta amarela indica a banda de 500 pb. Fonte: Autora.

Figura 9. Fluxograma da metodologia do projeto.



Esquema com o resumo das metodologias empregadas, bem como a amostragem em cada etapa (imagem gerada no programa *Lucid*). (*) 3 amostras foram utilizadas nos testes iniciais; (**) (***) 7 amostras não vieram com tecido suficiente para empregar os dois protocolos de extração; (****) 2 produtos de eluição não tiveram volume suficiente para a PCR convencional; (*****) Coletas aleatórias da superfície do tecido.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO

Dentre os dois protocolos testados para RNA, todos amplificaram o IC exógeno adicionado e/ou IC endógeno; e na extração de DNA o alvo endógeno amplificou, indicando que todos os protocolos empregados foram eficientes na etapa de extração tecidual (Rodrigues, 2022). Na extração de RNA (item 5.2.2), a média da concentração de ácido ribonucleico para o protocolo *In house* foi significativamente superior (784,50 ng/μL) ao comercial (98,09 ng/μL) ($p < 0,001$), bem como a do ácido desoxirribonucleico, 1.490,43 ng/μL e 120,70 ng/μL ($p < 0,001$), respectivamente. Ressalta-se que a amostragem do protocolo *In house* foi de cinco amostras, das quais três tiveram dois fragmentos de regiões distintas, resultando em oito produtos de extração, enquanto a do kit comercial foi de 212 (considerando a primeira e segunda eluição). Ao comparar apenas as amostras que passaram pelos dois processos de extração, temos os resultados apresentados na tabela 2.

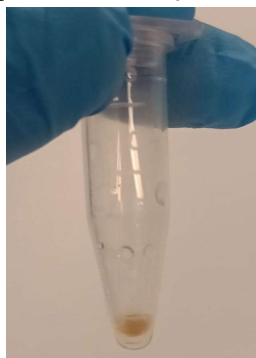
Tabela 2. Comparação na concentração do material genético recuperado com o ki para RNA e com o protocolo *In house*.

Amostra	<i>PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™)</i>		<i>In house</i>	
	Rendimento médio de RNA (ng/mL)	Rendimento médio de DNA (ng/mL)	Rendimento médio de RNA (ng/mL)	Rendimento médio de DNA (ng/mL)
1	91,6	142,0	326,0	1.735,0
2	194,0	215,5	2.399,0	3.085,0
5	128,4	69,5	593,2	1.669,0
5*	22,4	22,0	0	125,5
8	110,8	106,5	490,0	3.748,0
8*	18,8	22,0	1.091,0	59,0
15	23,2	29,5	757,6	1.176,0
15*	13,1	22,5	619,2	326,0
Média	75,29	78,69	784,50	1.490,43

Comparação feita apenas com as oito amostras que foram extraídas com ambas as metodologias. O * no kit comercial representa a segunda eluição, e no protocolo *In house*, outro fragmento da mesma amostra.

Quanto aos resultados de concentração, expostos na tabela 2, o protocolo *In house* recuperou maiores quantidades de DNA e RNA que os comerciais, mas apresentou valores de $A_{260/280}$ inferiores, indicando provável contaminação com proteínas (Kang *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2007). E resultou em eluidos com sedimentos marrons (Figura 10) que não diluíram no tampão de eluição, provavelmente decorrente da alta concentração de material genético e proteínas.

Figura 10. Foto representando um produto de extração com presença do sedimento.



Fonte: Autora.

Os testes iniciais feitos com esse protocolo com amostras contaminadas com material genético e amostra primária com C(t)s para SARS-CoV-2 já conhecidos, amplificaram em C(t)s superiores, gene E 36,6 e 33,20; RdRP 34,8 e 32,30 e N 36,0 e 32,2, respectivamente. Esse protocolo se mostrou mais trabalhoso, visto o uso de reagentes que demandam uso de capela (clorofórmio) e o tempo total de extração, que foi de quase 24h (contabilizando secção das amostras até a obtenção do eluído).

O kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen™) apresentou uma boa média A_{260}/A_{280} , indicando uma boa qualidade tanto do DNA como o RNA extraído (Sambroock; Russell, 2001; Oliveira et al., 2007). No entanto, os baixíssimos valores de A_{260}/A_{230} indicam presença de contaminantes orgânicos podendo ser dos próprios reagentes utilizados no kit, como a guanidina residual (Mathot, Wallin e Sjöblom, 2013).

Em relação aos parâmetros de qualidade o material genético extraído, com o kit comercial utilizado no protocolo para RNA, a relação A_{260}/A_{280} foi de 1.89 ± 0.46 e A_{260}/A_{230} foi de 0.78 ± 1.27 ; com a metodologia *In house*, obtivemos A_{260}/A_{280} foi de 1.50 ± 0.34 e A_{260}/A_{230} foi de 1.71 ± 1.36 (para RNA).

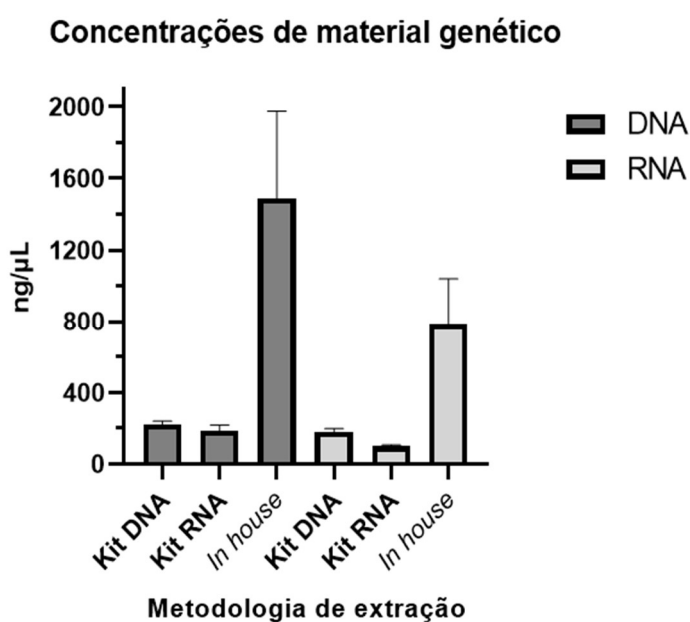
Tabela 3. Comparação dos parâmetros dos métodos de extração empregados.

Técnica de extração	Rendimento médio de DNA (ng/mL)	Média $A_{260}/280$	Média $A_{260}/230$	Rendimento médio de RNA (ng/mL)	Média $A_{260}/280$	Média $A_{260}/230$
<i>PureLink™ RNA Mini Kit</i> (Invitrogen™)	120,70 ± 166,17	1,86 ± 0,40	0,86 ± 1,76	98,09 ± 145,46	1,89 ± 0,46	0,78 ± 1,27
<i>In house</i>	1.490,43 ± 1.367,88	1,62 ± 0,27	2,23 ± 1,48	896,57 ± 704,06	1,50 ± 0,34	1,71 ± 1,36
<i>PureLink™ Genomic DNA Mini Kit</i> (Invitrogen™)	221,11 ± 284,59	1,69 ± 0,21	1,35 ± 0,79	181,61 ± 251,23	1,67 ± 0,21	1,40 ± 0,85

Resultados das médias e desvios padrões dos rendimentos e relações de absorvância de cada um dos protocolos utilizados no estudo.

Na extração de DNA (item 5.2.3), a média da concentração de ácido desoxirribonucleico foi de 221,11 ng/μL e de ácido ribonucleico 181,61 ng/μL. O kit *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™) recuperou uma concentração maior de RNA (181,61 ± 251,23 ng/μL) que o kit específico para extração de RNA (98,09 ± 145,46 ng/μL) ($p < 0,001$) e também demonstrou melhores relações de A_{260}/A_{230} ($p < 0,001$). No entanto, o kit tem uma qualidade inferior para o parâmetro $_{260/280}$ tanto para DNA (1.69 ± 0.21; 1.86 ± 0.40) ($p < 0,001$) quanto para RNA (1.67 ± 0.21; 1.89 ± 0.46) ($p < 0,001$).

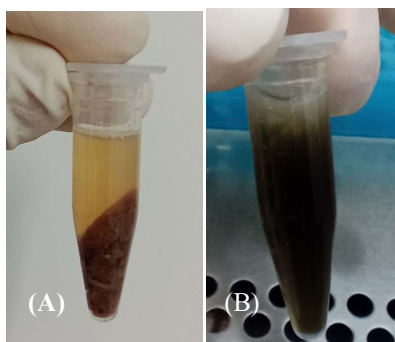
Figura 11. Concentração de material genético recuperado com cada um dos três métodos de extração.



Sendo os kits *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™), *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen™) (com todas as amostras testadas) e *in house* conforme Bratnagar e colaboradores (2012), respectivamente (imagem gerada no programa *GraphPad Prism 8*).

Observamos uma grande variação na concentração do material genético recuperado das amostras, e notamos que a consistência do tecido exerceu um impacto significativo no parâmetro. Amostras com aspecto mais "ressecado" apresentaram uma lise reduzida, resultando em menores quantidades de material genético detectado. Por outro lado, amostras com textura mais "gelatinosa" lisaram de forma mais eficaz, resultando em produtos com maiores quantidades de RNA/DNA, conforme observado na figura 12.

Figura 12. Comparação entre a lise de duas amostras.



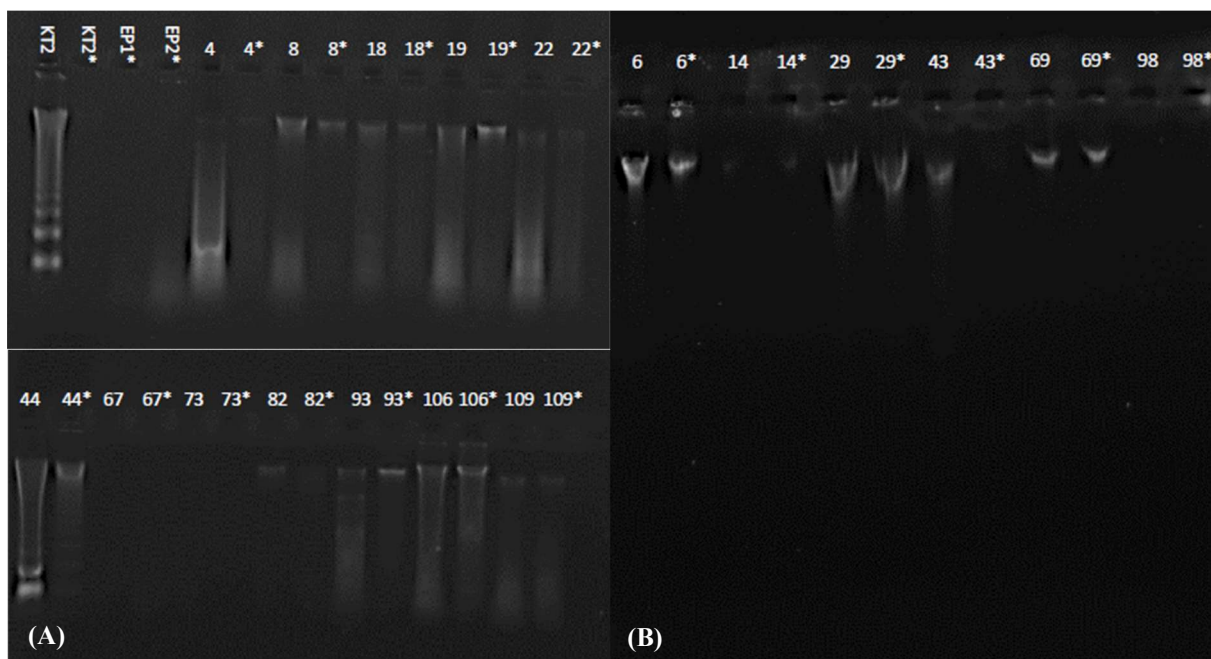
(A) Foto de uma amostra cujo tecido não lisou tão bem; (B) Foto de uma amostra cuja lise foi eficiente.

Fonte: Autora.

Quanto à integridade do RNA extraído, selecionamos aleatoriamente 14 amostras para avaliação em gel de agarose a 1,5%, cujo resultado pode ser observado na Figura 13(A). Dado que o método de extração utilizado tem maior especificidade para a recuperação de RNA, era esperado que o DNA presente estivesse degradado, evitando, assim, qualquer possível inibição da reação devido à presença desse DNA residual. Portanto, a presença de um arraste pronunciado representa um indicativo positivo, sinalizando a presença de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos moleculares, como discutido por Oliveira (2003). A exceção notável foi a amostra KT2 (Figura 12), que foi extraída com um protocolo *In house* e apresentou bandas íntegras.

No que se refere à integridade do DNA extraído, selecionamos aleatoriamente seis amostras e as avaliamos através de uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% (Figura 13B). Uma vez que o propósito principal do método de extração é a recuperação do DNA, se esperava que o DNA estivesse íntegro, permitindo a análise dos patógenos de interesse e resultando em bandas de alto peso molecular. Portanto, a presença de bandas sem um arraste notável representa um indicador positivo da integridade do DNA extraído.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose para avaliar a integridade de DNA das amostras.



(A)

(B)

(C)

Amostra	Extração de RNA			Extração DNA				
	Rendimen to médio de RNA (ng/mL)	Rendimen to médio de DNA (ng/mL)	Amostra	Rendimen to médio de RNA (ng/mL)	Rendimen to médio de DNA (ng/mL)	Amostra	Rendimen to médio de RNA (ng/mL)	Rendimen to médio de DNA (ng/mL)
KT2	619,2	326,0	44	20,8	391,0	6	104,0	127,5
KT2*	784,50	1.490,43	44*	26,8	40,0	6*	68,4	146,5
EP1	490,0	3.748,0	67	70,4	90,5	14	13,2	19,5
EP2	1.091,0	59,0	67*	33,2	13,9	14*	14,0	20,5
4	478,8	244,0	73	9,8	49,5	29	159,6	461,5
4*	27,2	70,5	73*	0,2	4,2	29*	128,0	200,0
8	110,8	106,5	82	114,0	13,1	43	57,2	51,5
8*	18,8	22,0	82*	24,8	1,8	43*	16,8	14,6
18	104,4	128,5	93	478,8	160,5	69	115,6	219,5
18*	35,6	35,0	93*	27,2	65,5	69*	327,2	844,0
19	171,2	211,5	106	168,0	245,5	98	6,4	7,0
19*	52,0	54,5	106*	164,0	217,5	98*	5,2	3,9
22	338,8	211,5	109	90,8	113,5			
22*	33,6	31,5	109*	42,8	64,0			

(A) Produtos de extração do protocolo de RNA: amostras KT2, EP1 e EP2 extraídas com protocolo *in house*; e amostras 4, 8, 18, 19, 44, 67, 73, 82, 93, 106 e 109 extraídas com o kit *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen™). Observar a presença de arraste nas amostras, indicando DNA degradado. (B) Produtos de extração do protocolo de DNA, com o aparecimento de bandas com pouco arraste, indicando DNA mais íntegro. (C) Tabela com as concentrações das amostras apresentadas em (A) e em (B).

Fonte: Autora.

No protocolo empregado para extração de RNA, 26 produtos da primeira eluição e seis amostras (ou seja, produtos da primeira e da segunda eluição) não amplificaram o controle endógeno, nesse caso, indicando a possibilidade de haver presença de algum inibidor ou até mesmo de uma falha na extração das seis amostras. Uma segunda corrida de RT-qPCR foi feita com as seis amostras, diluindo todos os produtos na proporção de 1:10 e todas tiveram a amplificação do IC e/ou controle endógeno, descartando assim a hipótese de não ter ocorrido a extração da amostra primária e indicando a presença de algum inibidor da PCR.

No protocolo empregado para extração de DNA, nove produtos da primeira eluição e quatro da segunda (sendo de amostras diferentes) não amplificaram o controle endógeno indicando a possibilidade da presença de algum inibidor de PCR, haja vista que a outra eluição referente a amostra teve o controle amplificado.

Vários fatores podem atuar como possíveis fontes de inibição nos produtos de extração. Entre esses fatores, a presença de hemoglobina da própria amostra é notável, uma vez que o íon Fe^{2+} presente na hemoglobina pode competir pelo sítio do Mg^{2+} , que é um cofator essencial para a atividade da DNA polimerase, resultando em inibição (Sambrook; Russell, 2001; Zaha; Ferreira; Passaglia, 2012). Além disso, a quantidade de material genético na amostra é um fator crítico, uma vez que a presença excessiva de DNA pode inibir a reação, enquanto a escassez de material genético pode resultar em detecção inadequada (Costa; Moura, 2001; Oliveira, 2003).

Em relação ao armazenamento das amostras, embora no presente estudo não tenha sido determinada a melhor abordagem de armazenamento, o Ministério da Saúde recomenda o armazenamento dos fragmentos de placenta coletados para pesquisa de ZIKV em ultrafreezer a $-70^{\circ}C$ até o envio aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) (Brasil, 2016). Além disso, Mathot e colaboradores (2011) sugerem o congelamento das amostras de tecido a $-80^{\circ}C$ para análises posteriores e demonstram uma boa estabilidade do RNA em amostras congeladas a $-70^{\circ}C$. De acordo com os protocolos de extração de Sambrook e Russell (2001), também é recomendado o armazenamento da amostra primária a $-80^{\circ}C$ como parte das boas práticas.

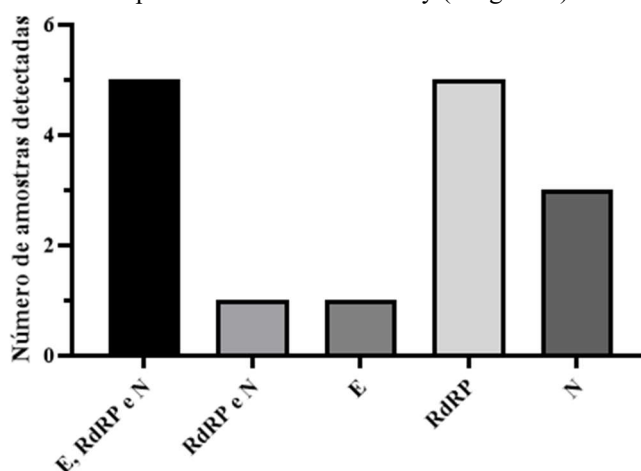
Das amostras com adição de estabilizante (Apêndice A), apenas 3 detectaram SARS-CoV-2, sendo as amostras 18 e 29 apenas para um gene e com C(t) de 38.22 (gene RdRP) e 39.26 (gene N), respectivamente. No entanto, a amostra 75 amplificou os três genes e, dentre todas as amostras positivas, foi a que teve CTs mais baixo (E gene- 23.58; RdRP- 23.87; N gene- 21.85), indicando uma melhor conservação do RNA.

6.2 DETECÇÃO DE SARS-COV-2

Das 110 amostras, 106 foram submetidas à RT-qPCR e os resultados obtidos podem ser visualizados no Apêndice B. Cinco (4,71%) amostras amplificaram os três genes alvo (E, RdRP e N); uma (0,94%) amplificou dois genes alvo (RdRP e N); e nove (8,49%) apenas um gene alvo, dessas, um para o gene E, cinco para o RdRP e três para o gene N (Figura 14).

O gene E é comum entre a família Coronaviridae, e os outros são específicos para SARS-CoV-2. Dessa forma, quando apenas o gene E amplifica, o resultado é “SARS-CoV-2 presuntivo positivo”, conforme o manual do kit disponibilizado pelo fabricante. Em nosso estudo, foram consideradas como detectadas as amostras que tiveram dois ou três genes detectados, conforme o estudo de Rodrigues (2022). Sendo assim, seis (5,66%) amostras foram detectadas para SARS-CoV-2.

Figura 14. Número de amostras que amplificaram pelo menos um alvo na PCR em tempo real utilizando o kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (Seegene®).



Comparação do resultado das amostras que amplificaram um gene, dois genes e três genes na PCR em tempo real para SARS-CoV-2 (imagem gerada no programa GraphPad Prism 8).

Na tabela 4 é possível observar os resultados obtidos na PCR com os respectivos valores de C(t) para as amostras cujos resultados foram “SARS-CoV-2 detectado”, bem como os controles endógenos e exógenos.

Tabela 4. Amostras detectadas para SARS-CoV-2 por PCR em tempo real.

Amostra	SARS-CoV-2									
	E gene	C(t)	RdRP gene	C(t)	N gene	C(t)	Endo IC	C(t)	Exo IC	C(t)
23	+	38.00	+	39.78	+	36.99	+	18.89	+	29.62
32	+	34.08	+	34.04	+	34.51	+	19.06	+	29.96
39	+	36.07	+	35.28	+	35.28	+	20.52	+	31.75
48	-	N/A	+	38.25	+	38.47	+	26.15	+	38.25
75	+	23.58	+	23.87	+	21.85	+	21.06	+	27.19
92	+	37.63	+	34.29	+	34.26	+	34.26	+	33.37

Comparação dos resultados das amostras detectadas quanto ao C(t) de cada um dos genes virais, bem como dos controles endógenos e exógenos, utilizando o kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (Seegene®).

Sinal positivo (+) indica amplificação e sinal negativo (-) indicação a não amplificação do alvo.

O resultado do presente estudo quanto a detecção de SARS-CoV-2 em tecido placentário de 5,66% é compatível ao esperado quando comparado à revisão bibliográfica de Gesaka, Obimbo e Wanyoro (2022) que relataram uma prevalência de transmissão vertical de 3 a 5% em gestantes com COVID-19 no momento do parto, sendo considerado infecção *in utero*, intraparto e pós parto. No trabalho de Mourad e colaboradores (2021), foram analisadas biópsias de 43 placentas de mulheres com COVID-19 no momento do parto (pacientes assintomáticas ou com sintomas leves, n = 36; e casos grave, n = sete), sendo que em duas amostras (uma proveniente de paciente com sintomas leves e a outra um caso grave) foram detectadas a presença do RNA viral. Também foram analisados os níveis de expressão placentária de RNAs mensageiros (mRNAs) para fatores de entrada do vírus, ACE2, TMPRSS2 e furina, sendo que a expressão de ACE2 foi maior em mulheres com COVID-19 grave. O grupo de pesquisa de Ocal e colaboradores (2022) trabalhou com uma amostragem de seis placentas provenientes de morte fetal intrauterina e cujas gestantes estavam infectadas por SARS-CoV-2 no momento do parto, sendo que em uma das biópsias coletadas o RNA viral foi detectado.

O *swab* coletado da placenta nº 39 detectou o material genético viral (Apêndice C), achado compatível com o resultado da extração tecidual (Tabela 5) e do publicado no relato de caso de Ferraiolo e colaboradores (2020), sobre a detecção em um *swab* de placenta na região próxima ao cordão umbilical imediatamente após o parto, a gestante em questão tinha resultado de *swab* de nasofaringe positivo para SARS-CoV-2 um dia antes do parto e estava assintomática. O *swab* do relato foi positivo para a pesquisa de RNA viral utilizando o kit de RT-qPCR Allplex™ 2019 n-CoV Assay (Seegene®).

Tabela 5. Amostra 39 detectada para SARS-CoV-2 por PCR em tempo real.

Amostra	SARS-CoV-2									
	E gene	C(t)	RdRP gene	C(t)	N gene	C(t)	Endo IC	C(t)	Exo IC	C(t)
39 Tecido	+	36.07	+	35.28	+	35.28	+	20.52	+	31.75
39 Swab	+	32.73	+	35.57	-	N/A	+	23.39	+	22.42

Comparação dos resultados da amostra 39 quanto ao C(t) de cada um dos genes virais da extração de fragmento de tecido e da coleta de *swab*, bem como dos controles endógenos e exógenos, utilizando o kit Allplex™ SARS-CoV-2 Assay (Seegene®).

Outro estudo foi feito por Penfield e colaboradores (2020), ao qual 11 amostras de *swabs* provenientes de placenta ou membrana (entre o âmnio e o córion viloso), de gestantes infectada, foram testadas na RT-qPCR com o kit *Xpert Xpress SARS-CoV-2* (Cepheid) e das onze, três tiveram resultado detectado.

6.3 DETECÇÃO DE *Treponema pallidum*

Das 110 amostras submetidas à qPCR para TP, nenhuma detectou TP (Apêndice D). Apesar disso, foi observada a detecção em uma placenta (0,91%) de *Haemophilus ducreyi* (HD), com C(t) de 33.18 e IC de 17.87.

Com relação à ausência de detecção de TP na única amostra do projeto cuja sorologia materna foi positiva, há o estudo de Genest e colaboradores (1996), no qual 38 gestantes tinham sorologia positiva para sífilis, mas em apenas seis amostras placentárias a PCR detectou o DNA do TP (15,79%).

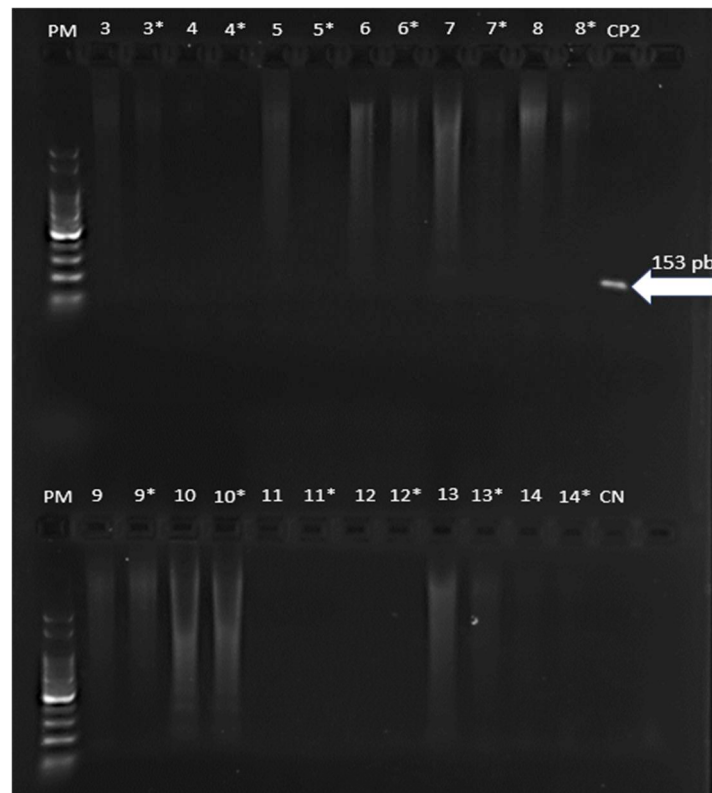
A úlcera genital causada por HD é conhecida como cancróide ou cancro mole e ocorre com maior frequência em homens e nas regiões tropicais no Pacífico Sul, Sudeste Asiático e África, no entanto tem baixa prevalência no Brasil, como demonstrou um estudo realizado em um centro especializado em IST em Manaus com 434 amostras de úlcera genital e cujo agente não foi detectado em nenhuma delas (Ramos *et al*, 2021; Peixoto *et al*, 2022).

O resultado da detecção de HD em gestante é concordante com Caetano e colaboradores (2022) que relataram o caso de uma gestante brasileira com lesões ulceradas cujo diagnóstico laboratorial foi “cancro de Rollet”, (associação da sífilis primária e cancro mole). Não temos os dados em relação ao tipo de parto de cada gestante, por essa razão não é possível inferir se o material genético é decorrente da ascensão da bactéria ao colo uterino ou do contato entre placenta e canal vaginal no momento do parto normal.

6.4 DETECÇÃO DE *Streptococcus agalactiae*

Das 108 amostras que foram submetidas à PCR convencional com iniciadores do gene *cfb*, nenhuma apresentou banda na região entre 100 pb e 200 pb, conforme os controles positivos (Apêndice E). No entanto, 111/216 produtos apresentaram um arraste acentuado no gel de agarose, provavelmente decorrente da alta concentração de DNA humano (Figura 15).

Figura 15. Eletroforese em gel de agarose de PCR para o alvo *cfb* de *S. agalactiae*.



Resultados da PCR para GBS das amostras 3 a 14. CP2: controle positivo; CN: controle negativo. PM: padrão de tamanho molecular de 100 pb.

Fonte: Autora.

No que se refere aos resultados da PCR convencional para a detecção de GBS, a presença de arraste em grande parte das amostras é atribuída à elevada concentração de DNA humano contida nos produtos de extração. Mesmo após a realização das diluições necessárias para a PCR convencional, resultando em concentrações finais de DNA situadas entre 100 e 200 ng/ L, visando preservar a sensibilidade da detecção e evitar a inibição da reação devido à sobrecarga de material genético, ainda observamos a persistência desse fenômeno (Oliveira, 2003). Sendo compatível com Costa e Moura (2001) que destacaram a possível inibição da reação devido ao excesso de DNA. Ainda, as observações reportadas por Cury, Furuse e Araújo

(2005), indicam que concentrações elevadas de DNA tendem a promover a formação de produtos não específicos, o que pode contribuir para a presença desse arraste indesejado.

7 CONCLUSÃO

Os kits comerciais testados mostraram boa recuperação de material genético para posterior execução da RT-qPCR/qPCR/PCR, o que permite a inserção dos protocolos dentro da rotina laboratorial e de pesquisa do LBMMS, bem como em qualquer laboratório que disponha de estrutura adequada. Além disso, a placenta demonstrou ser uma amostra biológica capaz de auxiliar na pesquisa de doenças congênitas e infecções maternas, havendo a presença do SARS-CoV-2 na placenta de mulheres que estavam infectadas no momento do parto. Não foram detectados TP e GBS nas amostras do presente estudo, mas não podemos descartar a possibilidade de detecção de TP e GBS em tecido placentário e mais estudos são necessários. A ausência de detecção de TP também pode refletir o cuidado no pré-natal dessas parturientes.

8 PERSPECTIVAS

- I. Implementar, no LBMMS, o protocolo de extração de tecido placentário;
- II. Adaptar o protocolo de extração de tecido placentário para outros tipos de tecido;
- III. Publicar artigo científico em parceria com a UFES, com os dados clínicos e o estudo anatomopatológico feito naquela instituição, e os resultados das testagens por qPCR para SARS-CoV-2;
- IV. Realizar pesquisa de patógenos da interface materno-fetal em amostras frescas;
- V. Compreender e resolver o problema do excesso de DNA/RNA de amostra humana ao trabalhar com PCR diretamente de amostra clínicas. Fato que limita a utilização das técnicas *In house*.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS (ACOG), 2019. **Prevention of early-onset group B streptococcal disease in newborns**. Disponível em: <https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/committee-opinion/articles/2020/02/prevention-of-group-b-streptococcal-early-onset-disease-in-newborns>. Acesso em: 22 out 2023.
- ALVES, E. V. **Determinação molecular dos sorotipos capsulares e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos em Streptococcus agalactiae isolados de pacientes atendidos no Hospital Universitário/UFSC na cidade de Florianópolis/SC**. 2018. 119 p. Dissertação (Mestre em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2018.
- ARORA, N. *et al.* Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. **Cell Host and Microbe**, 2017.
- BENETTI, E. *et al.* ACE2 gene variants may underlie interindividual variability and susceptibility to COVID-19 in the Italian population. **European Journal of Human Genetics**, v. 28, n. 11, 2020.
- BEZERRA, M. L. D. M. B. *et al.* Congenital syphilis as a measure of maternal and child healthcare, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 8, 2019.
- BEYERSTEDT, S.; CASARO, E. B.; RANGEL, É. B. COVID-19: angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility to SARS-CoV-2 infection. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 40, n. 5, p. 905–919, 2021.
- BRATNAGAR, Z. *et al.* **Molecular Detection and Typing of Dengue Viruses from Archived Tissues of Fatal Cases by RT-PCR and Sequencing: Diagnostic and Epidemiologic Implications**, 2012.
- BROKAW, A. *et al.* Bacterial and Host Determinants of Group B Streptococcal Vaginal Colonization and Ascending Infection in Pregnancy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2021.
- BRYANT-GREENWOOD, G. D. The extracellular matrix of the human fetal membranes: Structure and function. **Placenta**, v. 19, n. 1, 1998.
- BURGESS, A. W. O. *et al.* Adherence of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in the Rabbit Placenta. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 207, n. 2, 1994.
- BRASIL (2006). **Diretrizes para o controle da sífilis congênita**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. 2. ed. Brasília: [s. n.], 2006a. p. 15-16. ISBN 85-334-1157-X. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_sifilis_bolso.pdf. Acesso em: 12 maio 2023.
- BRASIL (2012). **Atenção ao Pré-Natal de Baixo Risco**. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 23 maio 2023.

BRASIL (2016). **Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou Alterações do Sistema Nervoso Central (SNC)**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 04 maio 2023.

BRASIL (2019). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Prevenção da Transmissão Vertical de HIV, Sífilis e Hepatites Virais**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 13 maio 2023.

BRASIL (2021). **Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 23 maio 2023.

BRASIL (2022a). **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 31 agosto 2023.

BRASIL (2022b). **Boletim Epidemiológico Sífilis 2022**. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde. Acesso em: 18 maio 2023.

BRASIL (2022c). **ANS aprova inclusão de teste rápido para diagnóstico da Covid-19 no rol de coberturas obrigatórias**. [S. l.], 2022g. Disponível em: <https://www.gov.br/ans/pt-br/assuntos/noticias/sobre-ans/ans-aprova-inclusao-de-teste-rapido-para-diagnostico-da-covid-19-no-rol-de-coberturas-obrigatorias-7>. Acesso em: 18 maio 2023.

CAETANO, I. F. *et al.* Cancro de Rollet na gestação. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 4, 2022.

CDC (2022). **Prevention Guidelines**. Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <https://www.cdc.gov/groupbstrp/guidelines/index.html>. Acesso em: 22 maio 2023

CHUN, J. High Multiplex Molecular Diagnostics: Shifting the Diagnostics Paradigm. **Seegene Bulletin**, v. 1, p. 1-4, 2012. Disponível em: https://seegenebrazil.com.br/wp-content/uploads/2019/07/TOCE_Seegene-ArtigoCientifico.pdf. Acesso em: 24 abr. 2023.

CHUN, J. Y. *et al.* Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 6, 2007.

CINDROVA-DAVIES, T.; SFERRUZZI-PERRI, A. N. Human placental development and function. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2022.

COSTA, M. L. The Placenta and its Underestimated Role in Clinical Practice and Research. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, 2022.

COSTA, M. R.; MOURA, E. F. Manual de extração de DNA. **Embrapa Amazônia Oriental**, 2001. 24 p.

FERRAILOLO, A. *et al.* Report of Positive Placental Swabs for SARS-CoV-2 in an Asymptomatic Pregnant Woman with COVID-19. **Medicina**, v. 56, n. 6, 2020.

GENEST, D. R. *et al.* Diagnosis of congenital syphilis from placental examination: Comparison of histopathology, steiner stain, and polymerase chain reaction for *Treponema pallidum* DNA. **Human Pathology**, v. 27, n. 4, 1996.

GESAKA, S. R.; OBIMBO, M. M.; WANYORO, A. Coronavirus disease 2019 and the placenta: A literature review. **Placenta**, 2022.

GRISARD, H. B. S. **Avaliação da expressão gênica da Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) e Serina Protease da Proteína Transmembrana 2 (TMPRSS2) em pacientes antes e após infecção por SARS-CoV-2.** 2022. 39 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, [S. l.], 2022.

HALL, J. *et al.* Maternal Disease with Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**, 2017.

HOFFMANN, M. *et al.* SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271- 280.e8, 2020.

HOOK, E. W. Syphilis. **The Lancet**, v. 389, 2017

KANG, I. N. *et al.* Identification of valid reference genes for reliable RT-qPCR in human normal and cancer brain cell lines. **Health**, v. 6, n. 1, p. 31-44, 2015.

LAFOND, R. E.; LUKEHART, S. A. Biological basis for syphilis. **Clinical Microbiology Reviews**, 2006.

LEE, D. TOCE: Innovative Technology for High Multiplex Real-time PCR. **Seegene Bulletin**, v. 1, p. 5-10, 2012. Disponível em: https://seegenebrazil.com.br/wp-content/uploads/2019/07/TOCE_Seegene-ArtigoCientifico.pdf. Acesso em: 24 abr. 2023.

LEE, Y. J. *et al.* Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. **Scientific Reports**, v. 4, 2014.

MATHOT, L.; LINDMAN, M.; SJÖBLOM, T. Efficient and scalable serial extraction of DNA and RNA from frozen tissue samples. **Chemical Communications**, 2011.

MOORE, KEITH L.; PERSAUD, T. V. N. Embriologia Clínica. 8. ed. **Elsevier**, 2008. 536 p. ISBN 978-85-352-2662-1.

MOTA, L. P. *et al.* Correlação da enzima DPP4 com a infecção por SARS-CoV-2. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 13, 2021.

MOURAD, M. *et al.* Placental response to maternal SARS-CoV-2 infection. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021.

OCAL, D. F. *et al.* The influence of COVID-19 pandemic on intrauterine fetal demise and possible vertical transmission of SARS-CoV-2. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, n. 61, 2022.

OLIVEIRA, M. C. S. *et al.* Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2007. 43p. ISBN 978-85-86764-12-7.

OLIVEIRA, W. P. Padronização e validação de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção da deleção delta F508 em pacientes com diagnóstico de fibrose cística acompanhados na unidade de pneumologia do Instituto da Criança. 2003. 73 p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade de São Paulo, [S. l.], 2003.

OPAS. **Organização Mundial da Saúde pública novas estimativas sobre sífilis congênita.** [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/noticias/28-2-2019-organizacao-mundial-da-saude-publica-novas-estimativas-sobre-sifilis-congenita>. Acesso em: 13 maio 2023.

OPAS. **Histórico da pandemia de COVID-19.** [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/covid19/historico-da-pandemia-covid-19>. Acesso em: 10 maio 2023.

PANFIELD, C. A. *et al.* Detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in placental and fetal membrane samples. **American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM**, 2020.

PATEL, S. *et al.* Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 94, 2017.

RADOLF, J. D. *et al.* Treponema pallidum, the syphilis spirochete: Making a living as a stealth pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, 2016.

RAMOS, M. C. *et al.* Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecções que causam úlcera genital. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 2021.

ROBERTS, V.; MYATT, L. Placental development and physiology. **UpToDate**, v. 2, n. algorithm 1, 2015.

RODRIGUES, I. D. **Deteção de sars-cov-2 em amostras nasofaríngeas com as técnicas de antigénio, RT-PCR e VITAPCR real time pcr.** 2022. 114 p. Dissertação (Mestre em Tecnologias Clínico-Laboratoriais) - Instituto Politécnico de Lisboa, [S. l.], 2022.

PEIXOTO, L. C., *et al.* Cancro mole: revisitando a infecção pelo Haemophilus ducreyi. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 4, 2022.

PENNEY, J. *et al.* Cycle threshold values and SARS-CoV-2: Relationship to demographic characteristics and disease severity. **Journal of Medical Virology** v. 8, n. 94, 2022

SAMBROCK, J.; RUSSELL, D. Molecular cloning: a laboratory manual. 3. ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001. v. 1, 2 e 3. 2231 p. ISBN 0-87969-576-5.

SCHWARTZ, D. A. *et al.* Pathology of the umbilical cord in congenital syphilis: Analysis of 25 specimens using histochemistry and immunofluorescent antibody to *Treponema pallidum*. **Human Pathology**, v. 26, n. 7, 1995.

SCHORNER, M. A. *et al.* Detection of Group B Streptococcus agalactiae from Anorectal and Vaginal Screening Tests. **Clinical Microbiology: Open Access**, v. 3, n. 5, 2014.

SEALE, A. C. *et al.* Stillbirth with Group B Streptococcus Disease Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. **Clinical Infectious Diseases**, 2017a.

SEALE, A. C. *et al.* Estimates of the Burden of Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, 2017b.

SEEGENE. **Allplex SARS-COV-2 Assay**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://seegenezbrasil.com.br/allplex-sars-cov-2-assay/?cn-reloaded=1>. Acesso em: 08 set. 2023.

SEEGENE. **Systems**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.seegene.com/system>. Acesso em: 24 abr. 2023.

SILVA, A. O. **Avaliação de protocolos de extração e purificação de DNA alvo da reação em cadeia da polimerase na detecção de *Leishmania (Viannia) spp.*** 2017. 77 p. Trabalho de conclusão de curso (Mestre em Ciências) - Fundação Oswaldo Cruz, [S. l.], 2017.

THERMOFISHER. **T042-TECHNICAL BULLETIN - 260/280 and 260/230 Ratios**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/uv-vis-spectrophotometry/instruments/nanodrop.html>. Acesso em: 24 maio 2023.

VARGHESE, P. M. *et al.* Host-pathogen interaction in COVID-19: Pathogenesis, potential therapeutics and vaccination strategies. **Immunobiology**, 2020.

VERMA, S. *et al.* SARS-CoV-2 colonization of maternal and fetal cells of the human placenta promotes alteration of local renin-angiotensin system. **Cell Press**, v. 2, n. 5, 2021.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. *Biologia molecular básica*. 4. ed. rev. [S. l.]: **Artmed**, 2012. 403 p. ISBN 978-85-363-2624-5.

WHO. **Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>. Acesso em: 26 maio 2023.

ANEXO A – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO *IN HOUSE* PARA RNA

1. 150 μ L de proteinase K (QIAGEN)
2. Incubar a 56°C/10 min e 45°C/noite
3. Incubar a 80°C/10 min
4. Adicionar 550 μ L de tampão de lise RLT (QIAGEN)
5. 700 μ L de ácido fenol: clorofórmio
6. Centrifugação a 13000 rpm por 15min
7. Transfira para um novo tubo
8. Adicionar 2 μ L de acrilamida e um volume de isopropanol
9. Incubar a 20°C/3 h
10. Centrifugar a 13.000 rpm a 4°C/30 min
11. Retirar o sobrenadante e lavar o sedimento com etanol 75%
12. Ressuspender com 20 μ L RNA “storage solution”
13. Armazenar em ultrafreezer -80°C

*Foi utilizado água livre de nuclease para a ressuspensão do material genético.

APÊNDICE A - TABELA DAS AMOSTRAS COM ADIÇÃO DE ESTABILIZANTE

Amostra	RNA Later	Amostra	RNA Later	Amostra	RNA Later
2	X	33	X	69	X
5	X	40	X	70	X
6	X	41	X	71	X
9	X	49	X	72	X
18	X	51	X	75	X
22	X	54	X	79	X
28	X	59	X	83	X
29	X	63	X	99	X
32	X	66	X	101	X

APÊNDICE B - TABELA COM RESULTADOS DE DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 EM TECIDO PLACENTÁRIO

Amostra	E gene	C(t)	RdRP gene	C(t)	N gene	C(t)	Endo IC	C(t)	IC	C(t)	Resultado
1	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	-	+	30.63	Não detectado
2	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	-	+	30.40	Não detectado
3	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.01	-	N/A	Não detectado
4	-	N/A	-	N/A	+	36.93	+	21.95	+	35.08	Não detectado
5	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	22.13	-	N/A	Não detectado
6	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.22	-	N/A	Não detectado
7	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	24.46	+	36.79	Não detectado
8	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.42	+	34.69	Não detectado
9	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	31.33	-	N/A	Não detectado
10	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.33	-	N/A	Não detectado
11	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.74	+	29.14	Não detectado
12	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	28.09	+	33.27	Não detectado
13	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.15	-	N/A	Não detectado
14	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	30.80	-	N/A	Não detectado
15	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	27.56	-	N/A	Não detectado
16	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	33.56	-	N/A	Não detectado
17	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	22.67	+	38.98	Não detectado
18	-	N/A	+	38.22	-	N/A	+	21.18	+	30.85	Não detectado
19	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.90	+	29.58	Não detectado
20	-	N/A	+	39.58	-	N/A	+	21.61	+	29.65	Não detectado
21	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.12	+	29.22	Não detectado
22	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	22.96	+	30.64	Não detectado
23	+	38.00	+	39.78	+	36.99	+	18.89	+	29.62	SARS-CoV-2
24	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.04	+	32.07	Não detectado
25	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.58	+	32.21	Não detectado

26	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.19	+	30.75	Não detectado
27	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.28	+	33.34	Não detectado
28	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.25	+	34.48	Não detectado
29	-	N/A	-	N/A	+	39.26	+	18.23	+	31.53	Não detectado
31	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.20	+	31.57	Não detectado
32	+	34.08	+	34.04	+	34.51	+	19.06	+	29.96	SARS-CoV-2
33	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	30.41	+	26.97	Não detectado
37	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.82	+	31.66	Não detectado
38	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.97	+	31.12	Não detectado
39	+	36.07	+	35.28	+	35.28	+	20.52	+	31.75	SARS-CoV-2
40	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.12	+	32.46	Não detectado
41	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.43	+	33.94	Não detectado
42	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.96	+	32.97	Não detectado
43	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.95	+	32.35	Não detectado
44	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.41	+	30.94	Não detectado
45	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.27	+	39.38	Não detectado
46	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.29	+	35.73	Não detectado
47	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.96	+	31.51	Não detectado
48	-	N/A	+	38.25	+	38.47	+	26.15	+	38.25	SARS-CoV-2
49	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.11	+	34.18	Não detectado
50	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	32.44	+	30.98	Não detectado
51	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.66	+	36.01	Não detectado
52	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	29.41	-	N/A	Não detectado
53	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	24.98	+	36.90	Não detectado
54	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	38.68	+	34.78	Não detectado
55	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.34	-	N/A	Não detectado
56	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	27.30	+	39.13	Não detectado
57	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	28.99	+	35.34	Não detectado
58	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.71	+	38.19	Não detectado

59	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	29.34	-	N/A	Não detectado
60	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.71	+	37.00	Não detectado
61	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.21	+	36.96	Não detectado
62	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	24.12	+	37.47	Não detectado
63	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.72	+	36.39	Não detectado
64	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.41	+	37.63	Não detectado
65	+	39.66	-	N/A	-	N/A	+	25.40	+	38.76	Não detectado
66	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	32.88	-	N/A	Não detectado
67	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.68	+	39.35	Não detectado
68	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	22.96	+	34.31	Não detectado
69	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.38	-	N/A	Não detectado
70	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	24.66	+	37.93	Não detectado
71	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.76	+	30.95	Não detectado
72	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	30.95	+	38.89	Não detectado
73	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	28.90	+	40.24	Não detectado
74	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	22.22	+	33.29	Não detectado
75	+	23.58	+	23.87	+	21.85	+	21.06	+	27.19	SARS-CoV-2
76	-	N/A	+	38.63	-	N/A	+	26.15	+	38.71	Não detectado
77	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	24.49	+	36.66	Não detectado
78	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.24	+	38.74	Não detectado
79	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.50	+	37.13	Não detectado
80	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.60	+	30.18	Não detectado
81	-	N/A	-	N/A	+	37.55	+	19.92	+	28.55	Não detectado
82	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.95	+	38.97	Não detectado
83	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	28.93	-	N/A	Não detectado
84	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	32.07	+	37.32	Não detectado
85	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	22.12	+	37.22	Não detectado
86	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.16	+	38.25	Não detectado
87	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.60	+	38.43	Não detectado

88	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	34.95	+	30.82	Não detectado
89	-	N/A	+	33.10	-	N/A	+	24.39	+	31.86	Não detectado
90	-	N/A	+	35.24	-	N/A	+	22.12	+	31.52	Não detectado
91	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.81	+	29.99	Não detectado
92	+	37.63	+	34.29	+	34.26	+	34.26	+	33.37	SARS-CoV-2
93	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.10	+	29.29	Não detectado
94	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	28.52	-	N/A	Não detectado
95	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.54	+	37.41	Não detectado
96	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.74	+	38.01	Não detectado
97	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.83	+	44.75	Não detectado
98	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	30.56	+	30.10	Não detectado
99	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.22	+	33.75	Não detectado
100	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	13.41	+	36.31	Não detectado
101	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.17	+	37.19	Não detectado
102	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.87	+	36.23	Não detectado
103	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.85	+	37.54	Não detectado
104	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.98	+	35.31	Não detectado
105	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.97	+	35.43	Não detectado
106	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.08	+	33.04	Não detectado
107	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.23	+	35.28	Não detectado
108	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.71	+	39.58	Não detectado
109	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.92	+	32.66	Não detectado
110	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.80	+	35.40	Não detectado

APÊNDICE C - TABELA COM RESULTADOS DE DETECÇÃO DE SARS-CoV-2 NOS *SWABS*

Amostra	E gene	C(t)	RdRP gene	C(t)	N gene	C(t)	Endo IC	C(t)	IC	C(t)	Resultado
37S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.12	+	24.80	-
38S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.83	+	22.69	-
39S	+	32.73	+	35.57	-	N/A	+	23.39	+	22.42	SARS-CoV-2
40S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	24.42	+	23.06	-
41S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	24.15	+	23.12	-
42S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	24.32	+	22.96	-
43S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.96	+	23.19	-
44S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.65	+	22.09	-
45S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.85	+	23.97	-
46S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.77	+	23.25	-
47S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	22.93	+	22.94	-
48S	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	23.97	+	23.85	-

APÊNDICE D – TABELA COM OS RESULTADOS DE DETECÇÃO PARA *Treponema pallidum*

Amostra	HSV1	C(t)	HSV2	C(t)	HD	C(t)	CMV	C(t)	LGV	C(t)	TP	C(t)	VZV	C(t)	IC	C(t)	Resultado
1	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.05	Não detectado
2	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.64	Não detectado
3	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.83	Não detectado
4	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.90	Não detectado
5	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.21	Não detectado
6	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.67	Não detectado
7	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.30	Não detectado
8	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.18	Não detectado
9	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.44	Não detectado
10	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.21	Não detectado
11	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.50	Não detectado
12	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.58	Não detectado
13	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.17	Não detectado
14	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.16	Não detectado
15	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.22	Não detectado
16	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.16	Não detectado
17	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.72	Não detectado
18	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.67	Não detectado
19	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.58	Não detectado
20	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.78	Não detectado
21	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.64	Não detectado
22	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.83	Não detectado
23	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.93	Não detectado

24	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	13.96	Não detectado
25	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.03	Não detectado
26	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.07	Não detectado
27	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.02	Não detectado
28	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.76	Não detectado
29	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.97	Não detectado
30	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.97	Não detectado
31	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.52	Não detectado
32	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.74	Não detectado
33	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	33.47	Não detectado
34	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.06	Não detectado
35	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.13	Não detectado
36	-	N/A	-	N/A	+	33.18	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.87	<i>Haemophilus ducreyi</i>
37	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.68	Não detectado
38	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	13.81	Não detectado
39	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.24	Não detectado
40	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.13	Não detectado
41	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.65	Não detectado
42	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.92	Não detectado
43	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.69	Não detectado
44	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.04	Não detectado
45	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.54	Não detectado
46	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.71	Não detectado
47	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.04	Não detectado
48	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.46	Não detectado
49	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.14	Não detectado
50	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	34.68	Não detectado

51	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.47	Não detectado
52	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.14	Não detectado
53	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.63	Não detectado
54	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	27.69	Não detectado
55	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.12	Não detectado
56	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.48	Não detectado
57	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.17	Não detectado
58	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.54	Não detectado
59	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.03	Não detectado
60	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.46	Não detectado
61	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.41	Não detectado
62	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.67	Não detectado
63	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.89	Não detectado
64	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.24	Não detectado
65	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.74	Não detectado
66	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.51	Não detectado
67	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.89	Não detectado
68	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.94	Não detectado
69	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.05	Não detectado
70	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.85	Não detectado
71	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.79	Não detectado
72	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	25.31	Não detectado
73	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.63	Não detectado
74	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.57	Não detectado
75	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.87	Não detectado
76	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.07	Não detectado
77	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.62	Não detectado

78	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.69	Não detectado
79	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.66	Não detectado
80	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.42	Não detectado
81	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.25	Não detectado
82	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.87	Não detectado
83	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.32	Não detectado
84	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.07	Não detectado
85	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.50	Não detectado
86	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.14	Não detectado
87	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.34	Não detectado
88	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	19.63	Não detectado
89	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.23	Não detectado
90	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.50	Não detectado
91	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.55	Não detectado
92	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.81	Não detectado
93	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.47	Não detectado
94	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.90	Não detectado
95	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.88	Não detectado
96	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	20.16	Não detectado
97	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.19	Não detectado
98	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	26.69	Não detectado
99	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.81	Não detectado
100	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	14.82	Não detectado
101	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	18.17	Não detectado
102	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	15.74	Não detectado
103	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.06	Não detectado
104	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.80	Não detectado

105	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.41	Não detectado
106	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	17.95	Não detectado
107	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	21.51	Não detectado
108	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.61	Não detectado
109	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.37	Não detectado
110	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	+	16.92	Não detectado

APÊNDICE E – FIGURAS COM OS RESULTADOS DE DETECÇÃO PARA *Streptococcus agalactiae*

