



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Rafael Emmanuel Godoy Martinez

**AMPLIFICAÇÃO MEDIADA POR TRANSCRIÇÃO E PCR EM TEMPO REAL: UM
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE METODOLOGIAS MOLECULARES NO
RASTREIO DE INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EM HOMENS**

FLORIANÓPOLIS
2024

Rafael Emmanuel Godoy Martinez

**AMPLIFICAÇÃO MEDIADA POR TRANSCRIÇÃO E PCR EM TEMPO REAL: UM
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE METODOLOGIAS MOLECULARES NO
RASTREIO DE INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EM HOMENS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado pela Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito parcial para
obtenção do título de licenciado em
Ciências Biológicas.

Dra. Maria Luiza Bazzo

**FLORIANÓPOLIS
2024**

MARTINEZ, Rafael Emmanuel Godoy
AMPLIFICAÇÃO MEDIADA POR TRANSCRIÇÃO E PCR EM TEMPO
REAL: UM ESTUDO COMPARATIVO ENTRE METODOLOGIAS MOLECULARES
NO RASTREIO DE INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS EM
HOMENS / Rafael Emmanuel Godoy MARTINEZ ; orientadora,
Maria Luiza Bazzo, 2024.

41 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas,
Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Infecções sexualmente
transmissíveis . 3. Comparação de metodologias
moleculares; Maria Luiza. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

RESUMO

Infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) continuam a ser um problema de saúde pública mundial e as bactérias estão entre os principais microrganismos responsáveis por estas infecções. A Organização Mundial da Saúde possui ótimas metas e objetivos para que nos próximos anos a afirmação anterior deixe de ser verdade. Os testes diagnósticos são um dos principais pilares para realização dessas metas e objetivos, buscando precisão, robustez e rapidez na hora de obter resultados. No contexto de testes moleculares, os mais recomendados para as ISTs são os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT's), como exemplo temos a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a amplificação mediada por transcrição (TMA). Nesse sentido, o presente trabalho buscou averiguar, por meio de uma análise comparativa, a sensibilidade e especificidade da metodologia de PCR em tempo real em relação ao TMA para os seguintes patógenos: *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Chlamydia trachomatis* (CT), *Mycoplasma genitalium* (MG) e *Trichomonas vaginalis* (TV). O teste *Allplex™ CT/NG/MG/TV assay* foi utilizado para PCR em tempo real e os testes *Aptima Combo 2* (Hologic®) *Aptima™ Trichomonas vaginalis assay* (Hologic®) e *Aptima™ Mycoplasma genitalium assay* (Hologic®) foram utilizados juntamente ao equipamento automatizado *Panther systems* (Hologic®) para o TMA. Obtivemos como sensibilidade e especificidade para CT 70,4% (CI95%; 49,8 – 86,2) e 98,4% (CI95%; 94,2 – 99,8), para NG 72% (CI95%; 50,9 – 87,9) e 97,6% (CI95%; 93,1 – 99,5) e para MG 51,9% (CI95%; 31,9 – 71,3) e 100% (CI95%; 97,0 - 100) respectivamente. O coeficiente Kappa foi utilizado para avaliar a correspondência dos resultados da PCR em tempo real em relação ao TMA, no qual foi possível observar para CT um coeficiente Kappa de 0,753, para NG de 0,744 e para MG de 0,638. Os resultados para TV não puderam ser calculados devido a não existência de resultados detectados no teste de PCR em tempo real. Para resultados mais confiáveis é possível que um terceiro teste, com outra metodologia possa ser utilizado.

Palavras-Chave: Diagnóstico molecular, comparação de metodologias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema do ensaio de clivagem e extensão de oligonucleotídeos de marcação (TOCE™)	21
Figura 2 Esquema de amplificação mediada por transcrição	23
Figura 3 Número de patógenos detectados de acordo com o método utilizado	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Número de patógenos detectados pelo método de amplificação mediada por transcrição de acordo com o sítio de coleta das amostras.	27
Tabela 2 Número de patógenos detectados pela PCR em tempo real de acordo com o sítio de coleta das amostras.	28
Tabela 3 Desempenho do teste Allplex™ CT/NGMG/TV assay	30
Tabela 4 Resultados divergentes por positividade.....	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Comparativo de resultados de <i>Mycoplasma genitalium</i> entre os testes	42
Quadro 2 Comparativo de resultados de <i>Chlamydia trachomatis</i> entre os testes	42
Quadro 3 Comparativo de resultados de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> entre os testes	42
Quadro 4 Comparativo de resultados de <i>Trichomonas vaginalis</i> entre os testes.....	42

LISTA DE ABREVIACÕES

HIV – Virus da Imunodeficiência Humana
HPV – Papiloma Virus Humano
MG – Mycoplasma genitalium
NG – Neisseria gonorrhoeae
TP – Treponema palidum
TV – Trichomonas vaginalis
ISTs – Infecções sexualmente transmissíveis
OMS – Organização Mundial da Saúde
DIP – Doença inflamatória pélvica
CT – Chlamydia trachomatis
NAATs – Testes de amplificação de ácidos nucleicos
IDH – Índice de Desenvolvimento Humano
OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde
EUA – Estados Unidos da América
LPS – Lipopolissacarídeos
PCR – Reação em cadeia de polimerase
TMA – Amplificação mediada por transcrição
RNA – Ácido ribonucleico
DNA – Ácido desoxirribonucleico

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

™ - *Trade Mark*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1. INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS	11
1.1.1. <i>Mycoplasma genitalium</i>	12
1.1.2. <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	14
1.1.3. <i>Chlamydia trachomatis</i>	15
1.1.4. <i>Trichomonas vaginalis</i>	16
1.2. MÉTODOS MOLECULARES	17
1.2.1. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	17
1.2.2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL.....	18
1.2.3. AMPLIFICAÇÃO MEDIADA POR TRANSCRIÇÃO	22
2 OBJETIVOS	24
2.1.OBJETIVO GERAL.....	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 METODOLOGIA.....	25
3.1.AMOSTRAGEM.....	25
3.2.AMPLIFICAÇÃO MEDIADA POR TRANSCRIÇÃO	25
3.3.EXTRAÇÃO DE DNA	26
3.4.AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO	26
3.5.ANÁLISE DOS DADOS	26
4 RESULTADOS	27
4.1 SÍTIOS DE COLETA.....	27
4.2 DETECÇÃO DOS PATÓGENOS	28
4.3 DESEMPENHO DOS TESTES	29
4.4 DIVERGÊNCIAS NAS DETECÇÕES	30
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1. INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

Vírus como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV - do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) e o Papiloma Vírus Humano (HPV - do inglês *Human Papiloma Virus*), bactérias como *Mycoplasma genitalium* (MG), *Neisseria gonorrhoeae* (NG) e *Treponema pallidum* (TP) e protozoários como *Trichomonas vaginalis* (TV) são alguns exemplos de diferentes grupos de microrganismos que podem causar Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs). É uma característica comum às ISTs transmissão pelo sangue, sêmen e fluidos corporais. Havendo diversas formas pelo qual o contágio é feito, pelo ato sexual (vaginal, anal ou oral), bem como por transfusão sanguínea ou de forma congênita. Existem algumas outras maneiras de se infectar, como pela amamentação, ou pelo contato direto de secreções/lesões contaminadas com uma região exposta do corpo (Center for Disease Control and Prevention, 2023b).

No ano de 2020, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), foi estimado que entre as ISTs curáveis, clamídia, gonorreia e tricomoníase, foram adquiridas por mais de 367 milhões de pessoas, atingindo separadamente, 129 milhões, 82 milhões e 156 milhões de casos, respectivamente. Também segundo a OMS, no continente americano é estimado mais de 13,8 milhões de casos de gonorreia e 29,8 milhões de casos de clamídia (World Health Organization, 2022). Contudo, no Brasil, nenhuma das infecções citadas anteriormente constam na lista nacional de notificação compulsória do Ministério da Saúde, ao contrário da sífilis, do HIV e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (aids - do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*) (Domingues *et al.*, 2021), em que é possível encontrar uma grande quantidade de dados epidemiológicos nacionais.

Segundo o Ministério da Saúde, em 2021, foram notificados 167,5 mil casos de sífilis adquirida, 74 mil casos de sífilis em gestantes e 29 mil casos de sífilis congênita e, em relação ao ano de 2020, todas apresentaram aumento na taxa de detecção a cada 100 mil habitantes, 32,9%, 12,5% e 14,6%, respectivamente (Ministério da Saúde, 2022c). Também segundo o Ministério da Saúde, em 2021 foram notificados 40,8 mil casos de infecções pelo HIV, o boletim traz que em relação ao ano de 2019 houve uma diminuição de 11,1% no total de casos, contudo, se fosse feito um recorte de 2020 em relação a 2021, é possível observar um aumento de 13,06% no número total de casos (Ministério da Saúde, 2022b). Diferentemente da infecção

pelo HIV, as hepatites virais estão desde 2018 em declínio contínuo em relação ao número de casos, algo que também pode ser observado pelo Boletim Epidemiológico das Hepatites Virais do ano de 2022 (Ministério da Saúde, 2022a). A OMS em resposta aos casos de infecção por HIV/aids, ISTs e hepatites virais, possui uma série de metas e objetivos para serem atingidos até o ano de 2030, tais como a redução de 90% da incidência global de NG e TP, redução para menos de 500 mil mortes por ano relacionadas ao HIV, redução de 65% das mortes por hepatite B e C, entre outras (World Health Organization, 2021).

Além dos inúmeros patógenos causadores de ISTs, os sintomas apresentados são ainda mais variados, sendo alguns bem comuns, como é o caso da infecção por MG, a qual pode causar uretrite, cervicite, endometrite, vaginite, doença inflamatória pélvica (DIP), entre outros. A maioria dos casos de ISTs no mundo compreendem pacientes assintomáticos, mas pelo fato de mesmo nesta condição ainda transmitirem os patógenos (JANSEN et al., 2020), é de extrema importância que o rastreio seja feito e mais do que isso, de forma precisa. Com isso em mente, existem diversos métodos para obter um diagnóstico e dependendo do provável patógeno associado à infecção, algumas metodologias são mais recomendadas do que outras, por exemplo, métodos sorológicos, para busca de antígenos e/ou anticorpos geralmente são mais rápidos e baratos; métodos de microbiologia como microscopia de campo claro (bacterioscopia) e cultivo estão geralmente associados aos patógenos bacterianos e fúngicos; para protozoários microscopia é o mais comum. Contudo, saber especificamente qual o patógeno está sendo investigado faz toda diferença, uma vez que bactérias como MG e CT não aparecem na bacterioscopia e nem crescem em meios de cultura convencionais. Nesses casos, assim como para os vírus, é recomendado o uso de metodologias moleculares como os Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAATs- do inglês *Nucleic Acid Amplification Tests*) que por sua vez, possuem sensibilidade e especificidade maior quando comparado a exames diagnósticos como a cultura e a bacterioscopia. (Unemo et al., 2021).

1.1.1. *Mycoplasma genitalium*

Isolado pela primeira vez em 1981 (Bjdrnellus et al., 2000), *Mycoplasma genitalium* (MG) é uma bactéria transmissível sexualmente, cuja ausência de parede celular e grande reatividade cruzada com outras bactérias do gênero *Mycoplasma* sp. inviabilizam testes diagnósticos como coloração de Gram e testes sorológicos. Além disso, o cultivo deve ser altamente evitado para fins diagnósticos, principalmente devido à grande demora para seu

crescimento em meio de cultura (Gnanadurai; Fifer, 2020). Por isso, métodos moleculares passam a ser os mais recomendados para diagnosticar possíveis infecções pelo *Mycoplasma genitalium*.

Existe uma carência de estudos que avaliem a prevalência de MG, tanto no Brasil quanto no mundo. Em 2011, MCGOWIN; ANDERSON-SMITS, avaliaram, nos Estados Unidos os dados de 40 estudos independentes buscando estimar sua incidência naquele país (MCGOWIN; ANDERSON-SMITS, 2011). Os autores avaliaram um total de 27.272 mulheres, das quais 8.434 foram consideradas de baixo risco e 18.838 de alto risco. Para o alto risco o estudo considerou aquelas que frequentavam clínicas de tratamento para ISTs, as que possuíam doenças urogenitais, pacientes atendidas em clínicas particulares, ou que se enquadravam como profissionais do sexo. Dentro dessas populações os autores encontraram uma prevalência de 2% em mulheres de baixo risco, contra 7,3% para mulheres de alto risco. O estudo também correlacionou a infecção por MG com inflamações do trato urogenital inferior, como corrimento vaginal, uretrite e cervicite, além de fazer a mesma relação com inflamações do trato genital superior, como DIP e infertilidade (McGowin; Anderson-Smits, 2011).

Outro trabalho publicado em 2018 realizou uma meta-análise, avaliando estudos que estimaram a prevalência de MG no mundo inteiro. Todos os estudos escolhidos avaliaram homens e mulheres e deveriam ter um quantitativo de, pelo menos, 500 participantes para inclusão. Os dados foram separados em países mais desenvolvidos e menos desenvolvidos, tomando como base o índice de desenvolvimento humano (IDH) de cada país. Em três países com alto IDH, Dinamarca, Grã-Bretanha e Estados Unidos da América, estimou-se uma prevalência de MG de 1,31% em homens e mulheres da população geral. Ademais, em três países com baixo IDH, Honduras, Vietnã e Tanzânia, a prevalência de MG foi de 3,86%, sendo possível observar uma diferença significativa entre as duas populações (Baumann *et al.*, 2018).

Existem determinados fatores que quando presentes podem favorecer infecções por patógenos sexualmente transmissíveis. Estes fatores de risco podem estar associados tanto com comportamentos pessoais como o número de parceiros sexuais em determinado intervalo de tempo, quanto por estar infectado por outros patógenos (Walensky *et al.*, 2021). Um estudo no Kenya com 258 profissionais do sexo, entre as idades de 18 e 35 anos, analisou a incidência de MG nesta determinada população e obteve um valor de 22,7 casos a cada 100 mulheres por ano. Também foi levado em consideração pelos autores a persistência de MG nessas mulheres ao longo de três, cinco ou mais que sete meses, obtendo um resultado de 17%, 9% e 21%, respectivamente, de infecções que resistiram nesse tempo (Cohen *et al.*, 2007). Todos os três

estudos foram realizados utilizando tecnologias moleculares (BAUMANN et al., 2018; COHEN et al., 2007; MCGOWIN; ANDERSON-SMITS, 2011).

1.1.2. *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae (NG) é um patógeno bacteriano descrito por Albert Neisser em 1879 por meio de uma bacterioscopia de corrimento uretral, quando ele observou diplococos gram-negativos com formato característico de café (Unemo *et al.*, 2019). Atualmente NG é uma das principais bactérias causadoras de ISTs, sendo considerada pela OMS um problema de saúde pública, principalmente devido à alta resistência aos antimicrobianos (Unemo *et al.*, 2021). A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) estima que em 2012 foram cerca de 11 milhões de novos casos da infecção apenas na região das Américas, totalizando mais de 14% dos novos casos globais (Pan-American Health Organization, 2018). Um estudo publicado em 2023 estimou que em 2020 a prevalência de infecções por NG no Brasil era de 0,63% (95% CI: 0,13–2,23) em mulheres de 15 a 49 anos e 0,70% (95% CI: 0,16–2,44) em homens de mesma idade (Gaspar *et al.*, 2023). Outro estudo publicado em 2024 obteve uma prevalência de NG, no Brasil, em mulheres grávidas de 0,6% de um total de 2728 mulheres grávidas (Miranda *et al.*, 2024).

Esta bactéria pode infectar tanto o trato urogenital, quanto faringe e reto, se aderindo principalmente ao epitélio urogenital (Unemo *et al.*, 2019), contudo, a respeito dos sintomas, eles são muito mais frequentes em homens com o trato urogenital infectado, chegando a quase 90% dos casos. Já em mulheres, os sintomas são geralmente inespecíficos, podendo, em muitos casos, apresentar grande semelhança com outras infecções (Ison; Deal; Unemo, 2013; Unemo *et al.*, 2019). Tradicionalmente o teste confirmatório para infecção por NG é a cultura bacteriana, a qual além de possuir um baixo custo, possibilita outros tipos de análises, como a de resistência aos antimicrobianos. Outro método extremamente comum para este diagnóstico é a microscopia de luz combinada com coloração de Gram. Contudo, ambas as metodologias apresentam limitações, atreladas primordialmente a carga bacteriana de cada coleta, dessa forma havendo uma grande variação de sensibilidade (Unemo; Golparian; Eyre, 2019). O principal diferencial de testes como os NAATs, se encontra justamente no diagnóstico de amostras com baixa carga bacteriana, como em homens assintomáticos e mulheres no geral, mas principalmente em amostras de sítios extragenitais, como anal e orofaringe, possuindo grande importância em estudos de rastreio (Blair *et al.*, 2019; Unemo; Shafer, 2014).

1.1.3. *Chlamydia trachomatis*

Isolada pela primeira vez em 1944 por Machiavello, contudo, em 1907 por dois associados de Albert Neisser, Halberstädter e von Prowazek, a bactéria *Chlamydia trachomatis* já havia sido observada em amostras de paciente com conjuntivite (Taylor-Robinson, 2017). Esta bactéria é transmitida predominantemente pela relação sexual, seja ela, vaginal, anal ou oral e assim como os patógenos tratados anteriormente, a *C. trachomatis* é normalmente assintomática, podendo causar nos homens uretrite e epididimite e nas mulheres é geralmente associada a cervicite sendo a maior causa conhecida de DIP. Ademais, a *C. trachomatis* além de complicações genitais, pode ser fortemente associada com linfogranuloma venéreo e conjuntivite de inclusão (WALENSKY et al., 2021).

No ano de 2018 nos EUA, estima-se que na faixa etária de 15 a 39 anos exista uma grande diferença tanto de incidência, quanto de prevalência, entre homens e mulheres. Obteve-se um total de 2,35 milhões de novas infecções em mulheres contra um total de 1,62 milhão em homens (Kreisel et al., 2021). Este dado participa de maneira direta no custo total de 19 bilhões de dólares que os EUA tiveram no ano de 2017 dentro do âmbito de cuidados médicos com ISTs (Phillips, 2019). Outro dado importante é o de prevalência, o qual na mesma população foi estimado em 2,41% para mulheres e 1,88% para homens de mesma idade, 15 a 39 anos (KREISEL et al., 2021).

A respeito de sua morfologia, a baixa presença de peptidoglicanas na região periplasmática e a presença de lipopolissacarídeos (LPS) modificados, determina uma morfologia similar à de bactérias gram-negativas. Contudo, devido a algumas peculiaridades de cadeia, torna-se inviável a coloração por Gram (Birkelund; Lundemose; Christiansen, 1989; Frej-Mądrzak et al., 2012). Existe uma defasagem para detecção de CT por microscopia de luz. Nesse sentido, outros métodos de detecção passam a ter mais importância. Durante muitos anos, o método microbiológico de cultura foi considerado o “padrão ouro” dentro dos laboratórios, devido, principalmente, à alta sensibilidade e ao potencial mínimo para contaminação (Black, 1997). Atualmente, a grande variabilidade na sensibilidade de testes por cultura, a necessidade de organismos viáveis e o tempo elevado para obtenção de resultado, podem acarretar um alto custo de insumos e de pessoal especializado. Nesse sentido, a PCR, um método molecular baseado na amplificação de ácidos nucleicos, passa a fazer mais sentido, possuindo uma sensibilidade e especificidade maior que a cultura celular. Assim como a PCR, a amplificação

mediada por transcrição (TMA) também pode ser utilizada e apresenta a vantagem de possuir uma aparente maior sensibilidade, devido a busca direta por RNA ribossomal, ácido nucleico mais abundante na célula (Black, 1997; Kelly *et al.*, 2017; Shetty *et al.*, 2021).

1.1.4. *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis (TV), descoberto em 1836, é o único dos quatro patógenos trabalhados neste estudo que não é uma bactéria, mas sim um protozoário ciliado de formato amebóide (Harp; Chowdhury, 2011). *T. vaginalis* é o patógeno não viral mais prevalente, correspondendo a quase 50% dos casos de ISTs curáveis no mundo (World Health Organization, 2022). Pacientes assintomáticos também compreendem a maioria dos casos, contudo, 33% das mulheres com esta característica passam a apresentar sintomas após 6 meses de infecção (Petrin *et al.*, 1998; Rowley *et al.*, 2019). Os principais sintomas são dor ao urinar e durante o sexo, bem como corrimento vaginal espesso. Muitos sintomas convergem com os apresentados por infecções por *M. genitalium* e *N. gonorrhoeae*, contudo, o corrimento vaginal pode apresentar um forte odor, característico desta infecção (Edwards *et al.*, 2016).

A tricomoníase não possui programas de vigilância epidemiológica na maioria dos países (Poole; McClelland, 2013), tornando difícil seu controle de incidência e prevalência. Dessa forma, estudos localizados são muito importantes em uma tentativa de avaliar estes índices (Edwards *et al.*, 2016). No Brasil, um estudo realizado com mulheres grávidas obteve um valor de prevalência de 6,7% (Miranda *et al.*, 2024). Nos Estados Unidos existem alguns estudos que levam em conta tanto a prevalência, quanto a incidência. Um trabalho publicado em 2018 levou em consideração dados obtidos nos anos de 2013 e 2014, obtendo um valor de prevalência de 0,5% para homens e 1,8% para mulheres. Analisando outros dados obtidos, foi possível fazer uma forte relação de pacientes infectados e sua situação socioeconômica (Patel *et al.*, 2018).

No estudo citado anteriormente, foram utilizados kits do tipo NAAT para detecção do TV, mais especificamente o Hologic Gen-Probe Aptima® *T. vaginalis* assay (Patel *et al.*, 2018). Tendo uma situação na qual a maioria dos casos de homens são assintomáticos, bem como quase 50% das mulheres, testes de maior confiabilidade são de extrema importância. A cultura de TV, outrora considerada o padrão ouro para seu diagnóstico (Bachmann *et al.*, 2011; Kissinger, 2015a), não é mais vista dessa forma. As desvantagens expostas pela técnica de cultura, como grande intervalo entre a coleta e o resultado, além de uma baixa sensibilidade

quando comparada com NAATs, fazem com que métodos moleculares sejam mais recomendados para este fim, apesar de existir uma dificuldade para com profissionais treinados e equipamentos mais caros (Edwards *et al.*, 2016).

1.2. MÉTODOS MOLECULARES

1.2.1. Reação em cadeia da polimerase

A origem de uma das técnicas mais utilizadas por laboratórios no mundo todo, a PCR, é um tanto quanto conturbada, contudo, ela é fortemente atribuída ao químico Kary Mullis (Kaunitz, 2015) que em 1985, juntamente com seus colaboradores, publicaram um trabalho descrevendo a técnica pela primeira vez (SAIKI *et al.*, 1985). Atualmente, a técnica de PCR convencional utilizada difere um pouco da original. Com o passar dos anos, inúmeras descobertas e melhorias foram feitas na reação, como a descoberta de uma DNA polimerase termoestável e a criação de um equipamento capaz de realizar ciclagens de temperaturas programáveis com precisão. Para realizar a reação são necessários uma série de reagentes, cada um com uma função específica, alguns sendo facultativos, variando a cada protocolo, e alguns imprescindíveis, como o par de iniciadores, senso e antisenso, a DNA polimerase termoestável, os nucleotídeos livres trifosfatados, o DNA molde contendo o alvo e o cofator da DNA polimerase, Mg^{2+} . Sem qualquer um desses reagentes a reação não poderá ocorrer. Não somente, em uma reação de PCR convencional se faz necessário uma confirmação de que a reação funcionou e o alvo correto foi amplificado. Esta confirmação geralmente é feita com uma corrida de eletroforese, usando gel de agarose ou poliacrilamida, por exemplo (CANENE-ADAMS, 2013).

A reação em si, busca multiplicar exponencialmente uma região específica do material genético alvo. No âmbito de diagnósticos laboratoriais, possui o objetivo de averiguar sua presença ou não. Esta multiplicação exponencial ocorre a partir de uma repetição metódica de três passos em um termociclador: **desnaturação**, **pareamento** e **extensão**. Em cada um destes passos o termociclador deve manter a reação em uma temperatura específica para que ela possa ocorrer. No início, o DNA molde está em sua conformação padrão, ou seja, em fita dupla, por isso a etapa de **desnaturação** ocorre a uma temperatura alta, variando de 94°C a 98°C. Uma vez que a fita dupla foi completamente separada, o termociclador começa a diminuir a temperatura até atingir a temperatura ideal de pareamento dos iniciadores, variando de 45°C a

60°C. É neste momento que a etapa de **pareamento** ocorre, onde os iniciadores começam a hibridizar em suas regiões complementares no DNA molde possibilitando que a reação continue. Quando finalizada esta etapa, o termociclador começa a elevar novamente a temperatura, desta vez até que se torne ideal para o funcionamento da DNA polimerase, geralmente variando de 70°C a 80°C, na qual a etapa de **extensão** ocorre e, no caso da *Taq* DNA polimerase, seria de 72°C a temperatura ótima para seu funcionamento (Canene-Adams, 2013; Maddocks; Jenkins, 2016; Tao *et al.*, 2022).

Em uma reação 100% eficiente, o total de material genético é dobrado a cada ciclo. Dessa forma, se esses passos forem repetidos algumas vezes a curva de crescimento seguirá um padrão exponencial até que fatores limitantes, como o consumo dos reagentes, passem a tomar conta da reação, levando-a a um platô. Algumas considerações importantes, o tempo que o termociclador fica em cada temperatura é programado para cada reação e varia em cada protocolo considerando alguns fatores que podem influenciá-la, como por exemplo o tamanho do alvo a ser amplificado, a quantidade de cada reagente e as enzimas utilizadas (Canene-Adams, 2013; Maddocks; Jenkins, 2016).

1.2.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Assim como a PCR convencional, a PCR em tempo real tem o objetivo de amplificar uma região específica do DNA. Dentre os principais avanços da PCR em tempo real estão a capacidade de monitorar em tempo real os ciclos da reação, a possibilidade de quantificar o material genético de cada amostra, de maneira relativa ou absoluta, o fato de ter uma sensibilidade e especificidade maior e um limite de detecção menor quando comparado com outros métodos moleculares e não moleculares (Heid *et al.*, 1996; Singh; Roy-Chowdhuri, 2016). A reação é baseada na análise da fluorescência emitida, a qual é detectada pelo próprio termociclador em tempo real. Há pelo menos a adição de um novo reagente, comparando com a PCR convencional, relacionado com a emissão de fluorescência, como um intercalante de DNA, o sendo o SYBR® Green o mais utilizado, ou uma sonda fluorescente, como a TaqMan®. Cada um destes reagentes funciona de maneira diferente e por este motivo apresentam formas de leitura também diferentes (Harshitha; Arunraj, 2021; Tao *et al.*, 2022).

O SYBR® Green por exemplo, emite naturalmente fluorescência quando excitado e uma vez ligado à dupla-fita da molécula de DNA, emite uma fluorescência ainda maior. No final de cada etapa de **extensão**, onde tem-se a maior quantidade de DNA dupla-fita do ciclo, o

termociclador em tempo real consegue captar um aumento grande de emissão de fluorescência. Embora esta seja uma técnica sensível, sendo possível detectar a presença do alvo sempre que existir uma molécula de DNA dupla-fita, há possibilidade de erros de interpretação em decorrência de moléculas inespecíficas amplificadas ou da presença de dímeros de iniciadores que também formam dupla-fita. Atualmente existem algumas alternativas para esse problema, como a análise da curva de dissociação que parte do pressuposto que o alvo desejado possui tamanho e quantidades de guanina e citosina diferentes do alvo inespecífico amplificado, desta forma uma etapa extra da reação, específica para esta análise seria capaz de diferenciar os produtos inespecíficos do produto alvo (Harshitha; Arunraj, 2021; Navarro *et al.*, 2015; Singh; Roy-Chowdhuri, 2016).

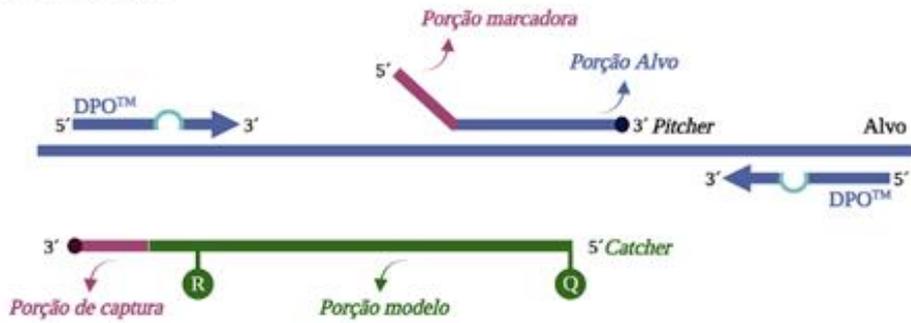
Já a sonda TaqMan® funciona de maneira diferente. Ela consiste em um oligonucleotídeo que possui um fluoróforo ligado à extremidade 5' e um *quencher* ligado à extremidade 3', este, devido à proximidade com o fluoróforo inibe sua fluorescência. A sonda é complementar a uma região do DNA alvo próxima da região complementar dos iniciadores e durante a etapa de **pareamento**, a sonda irá hibridizar próxima aos iniciadores. Avançando na reação, durante a fase de **extensão**, a DNA polimerase, devido a sua atividade 5' exonuclease cliva a sonda, separando espacialmente o *quencher* do fluoróforo que por sua vez passa a emitir fluorescência. Conforme a reação avança, o número de cópias de DNA dobra a cada ciclo e a fluorescência captada pelo termociclador aumenta, sendo esta, diretamente proporcional a quantidade de sondas clivadas pela DNA polimerase. Esta técnica possui especificidade maior que do que o uso de intercalantes de DNA, porque a emissão de fluorescência está diretamente ligada à clivagem da sonda ligada a uma sequência específica. Outra característica desta técnica é a possibilidade de quantificação, sem necessariamente analisar a curva de dissociação, utilizando um padrão com uma quantidade inicial conhecida de material genético é possível deduzir a quantidade inicial de DNA (Harshitha; Arunraj, 2021; Navarro *et al.*, 2015).

Novas demandas costumam aparecer com o tempo e concomitantemente a isso, novas tecnologias tendem a surgir. Buscando obter maior sensibilidade e especificidade, a empresa sul coreana Seegene® desenvolveu uma série de novas tecnologias para alcançar este objetivo como ilustrado na figura 1. O DPO™ (do inglês - *Dual Priming Oligonucleotide*), TOCE™ (do inglês - *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension*) e MuDT™ (do inglês - *Multiple Detection Temperature*) são os principais desenvolvimentos. O DPO™ consiste em um desenho diferente de iniciadores. Enquanto os tradicionais apresentam uma única sequência contínua de nucleotídeos, o DPO™ possui duas sequências e, se ambas não hibridizam no alvo, elas não

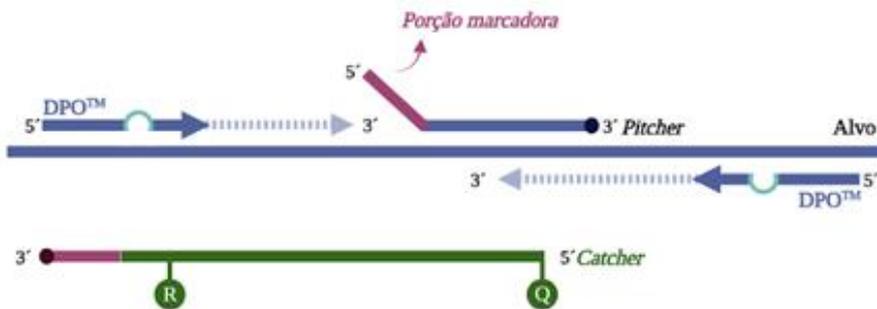
permitem sua extensão. Com tamanhos diferentes e intercaladas por uma molécula de polidesoxinosina, as sequências possuem temperaturas de dissociação (T_m) diferentes e dessa forma tendem a parear em momentos diferentes do ciclo. Primeiro a de maior tamanho, e conseqüente maior T_m , caso seu pareamento ocorra de maneira correta, a sequência menor, e conseqüente menor T_m , possivelmente irá parear em seguida. Contudo, caso a sequência de maior tamanho não hibridize corretamente, não será possível que a outra o faça e dessa forma a extensão não ocorrerá. Outra possibilidade que impediria a extensão seria se a primeira sequência conseguisse hibridizar, mas a segunda não encontrasse a mesma correspondência. Estas características conferem mais segurança e confiabilidade ao DPO™ em relação aos iniciadores tradicionais (CHUN et al., 2007).

Figura 1 Esquema do ensaio de clivagem e extensão de oligonucleotídeos de marcação (TOCE™)

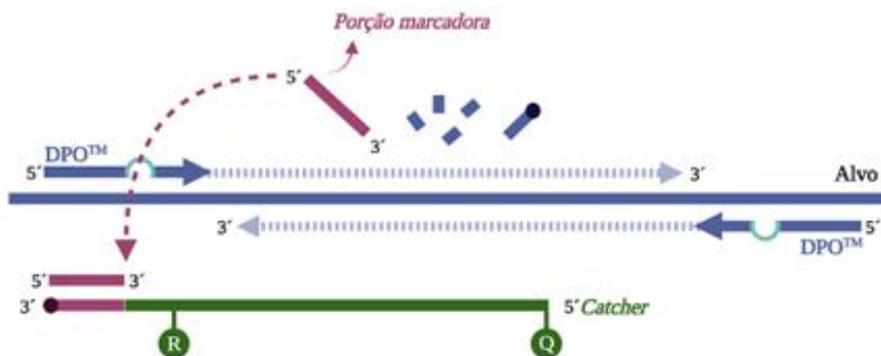
Anelamento



Extensão de Iniciadores



Clivagem do Pitcher e anelamento da porção marcadora no Catcher



Extensão da porção marcadora e geração de sinal luminoso



Fonte: Wachter, 2023.

O TOCE™, como ilustrado na figura 1, consiste em dois oligonucleotídeos extras a serem adicionados na reação, o *Pitcher* e o *Catcher*. O *Pitcher* possui a região 3' complementar específica ao alvo e a 5', chamada de porção ligante, complementar à porção capturadora

presente no *Catcher*. Durante a extensão, a DNA polimerase devido sua atividade 5' exonuclease cliva o *Pitcher* liberando a porção ligante. Ela irá se comportar como uma espécie de iniciador e por complementaridade hibridiza na porção capturadora do *Catcher*, o qual também será estendido pela DNA polimerase. O *Catcher* em sua estrutura possui um fluoróforo e um *quencher* que o inibe, quando o *catcher* está em dupla-fita, após ser estendido, a ação do *quencher* é diminuída drasticamente, consequentemente permitindo que o fluoróforo emita sua fluorescência. O grande salto desta tecnologia está na possibilidade de superar a afirmação “um alvo, um canal” que se manteve por muito tempo na indústria. Utilizando um máximo de cinco pares de *Pitchers* e *Catchers* e adicionando uma etapa de análise da temperatura de dissociação à reação, torna-se possível superá-la, a partir da discriminação em um mesmo canal de até cinco alvos diferentes, desde que suas temperaturas de dissociação sejam conhecidas e diferentes (CHUN; LEE; HWANG, 2012).

A última tecnologia, o MuDT™, diferentemente das anteriores não compreende algo físico, mas na verdade é a criação de uma técnica de análise revolucionária. Em conjunto com o TOCE o MuDT™ além de possibilitar a identificação de múltiplos alvos em um mesmo canal, permite a obtenção de dados quantitativos pela análise do Cts de cada alvo, entretanto sem a necessidade de uma etapa extra para análise da curva de dissociação (LEE et al., 2014).

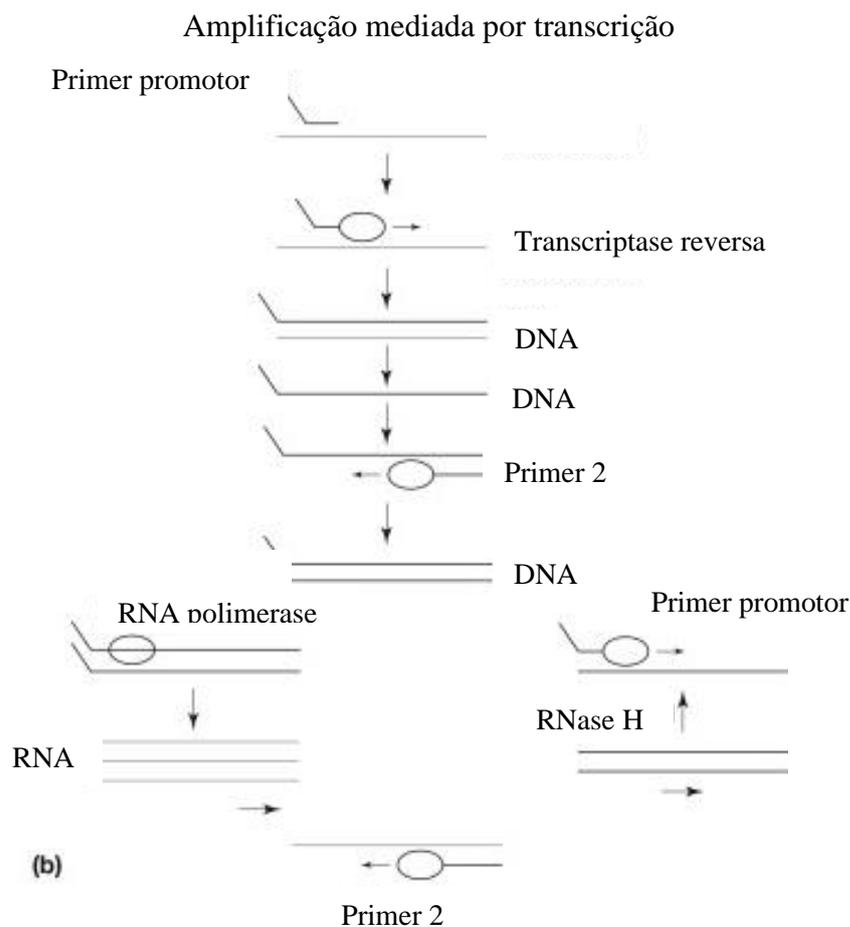
1.2.3. Amplificação mediada por transcrição

Como método molecular, também existe a amplificação mediada por transcrição (TMA - do inglês *Transcription-Mediated Amplification*) que, assim como a PCR, compreende um NAAT e dessa forma busca identificar um alvo a partir da amplificação de ácidos nucleicos presentes nele (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2023a). A PCR geralmente utiliza o genoma do microrganismo, seja ele de DNA ou RNA, contudo, existem outras moléculas possíveis de amplificação, como o RNA ribossomal (rRNA), geralmente utilizado na TMA. Neste caso, ao invés de existir apenas uma molécula por célula, como ocorre com o genoma, o rRNA pode ser encontrado em maior abundância dentro da mesma célula, permitindo que a cinética da reação seja facilitada e possivelmente aumentando a sensibilidade da reação (WROBLEWSKI et al., 2006).

Desenvolvida pela Gen-Probe, inicialmente apenas para o uso em pesquisas, o TMA é uma reação isotérmica, ou seja, não exige, ou, exige baixa variação de temperatura durante a amplificação. A amostra em questão deve ser lisada, buscando expor o rRNA que por meio de

partículas magnéticas são isoladas de qualquer outro material alvo inespecífico ou possível inibidor. A reação de TMA é baseada em ciclos de amplificação, os quais têm início com a enzima transcriptase reversa gerando uma molécula de DNA complementar (cDNA) a partir do rRNA. Esta mesma enzima, após concluir a transcrição reversa, degrada a fita de rRNA e utiliza a molécula restante de cDNA como molde para formar uma molécula de DNA dupla fita (dfDNA). O dfDNA por sua vez servirá de molde para a RNA polimerase dependente de DNA, conseqüentemente gerando uma grande quantidade de produtos de amplificação de RNA, como exemplificado na figura 2. Uma vez formados, estes produtos podem servir tanto como molde para transcriptase reversa, dando continuidade ao ciclo, quanto como alvo para moléculas quimioluminescentes, possibilitando avaliar a presença do material genético de determinado patógeno. É importante salientar que esses processos podem ocorrer simultaneamente centenas de milhares de vezes por célula (Werneck; Mullen, 2014).

Figura 2 Esquema de amplificação mediada por transcrição



Fonte: Adaptado de Werneck; Mullen, 2014

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Comparar as metodologias moleculares de PCR em tempo real e amplificação mediada por transcrição no rastreamento de ISTs em homens assintomáticos

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real com a metodologia TMA, padrão ouro para o rastreamento de ISTs.
- Avaliar o teste *Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®) com *score* Kappa para comparação das duas metodologias moleculares.

3 METODOLOGIA

3.1. AMOSTRAGEM

Durante o ano de 2022 e início de 2023 foi realizada a coleta de 491 amostras de homens assintomáticos em quatro Centros de Saúde do município de Florianópolis. A coleta foi feita em três sítios anatômicos distintos, anal, oral e uretral utilizando o meio de coleta e de transporte *Aptima Multitest Swab Specimen Collection Kit* (Hologic®). As coletas dos sítios extragenitais (anal e oral) não foram padronizadas, uma vez que não estavam especificadas na bula. Após a coleta, as amostras foram identificadas e armazenadas em geladeira (4 a 8°C) até que o teste fosse realizado, respeitando as condições e período de armazenamento definidas pelo fabricante para serem processadas no equipamento *Panther System Hologic®*. Após serem utilizadas no equipamento automatizado todas as amostras foram armazenadas em ultrafreezer -80°C. Para o estudo comparativo, do total das 491 amostras processadas, foram incluídas todas as amostras com resultado detectado para pelo menos um patógeno (n=75) e uma quantidade equivalente de amostras não detectadas (n=75), considerando o mesmo quantitativo por sítio anatômico, totalizando 150 amostras.

3.2. AMPLIFICAÇÃO MEDIADA POR TRANSCRIÇÃO

Previamente ao processo de detecção dos patógenos foi feita limpeza e checagem do equipamento automatizado, com objetivo de evitar qualquer tipo de contaminação pelas amostras antes processadas ou qualquer tipo de erro do equipamento. Concluída esta etapa, os insumos necessários, como ponteiras e meio de reação foram colocados em seus respectivos locais. Para testagem de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* foi utilizado o kit de amplificação e detecção *Aptima Combo 2* (Hologic®), para MG e TV os kits *Aptima Mycoplasma genitalium assay* (Hologic®) e *Aptima Trichomonas vaginalis assay* (Hologic®) foram usados, respectivamente. Cada kit é composto por uma série de reagentes.

As amostras foram inseridas para processamento e os resultados foram apresentados pela ordem em que a programação dos kits de detecção foi feita, ou seja, se o teste para clamídia e gonorreia foi o primeiro, a detecção desses patógenos foi feita para todas as amostras antes de ter início o teste para algum outro patógeno. Após a obtenção dos resultados, todas as

amostras foram retiradas, organizadas em estantes por detectados e negativas e guardadas no freezer -80°C. Todos os resultados foram conferidos manualmente e registrados em tabela.

3.3. EXTRAÇÃO DE DNA

A fim de obter o material genético dos possíveis patógenos, CT, NG, MG e TV, foi realizada extração do DNA de todas as amostras detectadas (n=75), bem como das 75 amostras negativas. Todas as extrações foram utilizando o *Kit ReliaPrep™ gDNA Blood Miniprep System* (Promega, EUA) e seguindo as orientações do fabricante. Importante ressaltar que será discutido neste trabalho os problemas encontrados nesta etapa em relação à eventual incompatibilidade entre reagentes de empresas diferentes.

3.4. AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO

Com as amostras devidamente extraídas, por meio de uma reação em cadeia da polimerase em tempo real, utilizando o *Kit Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®) foi possível identificar a presença de qualquer um dos quatro patógenos, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* e *Trichomonas vaginalis*, tanto patógeno único ou em coinfeção. Após concluída a reação, os resultados foram analisados utilizando o software *Seegene Viewer* (Seegene).

3.5. ANÁLISE DOS DADOS

Uma vez obtidos os resultados da PCR em tempo real (Seegene®), foi possível comparar com os resultados previamente obtidos pelo *Panther Systems* (Hologic®). Sendo possível realizar os cálculos de sensibilidade e especificidade do *Kit Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®) de PCR em tempo real em relação ao TMA e seus testes para CT e NG *Aptima Combo 2* (Hologic®), para MG *Aptima Mycoplasma genitalium assay* (Hologic®) e para TV *Aptima Trichomonas vaginalis* (Hologic®). Com estes resultados foi possível calcular, utilizando primeiramente o software gratuito *The jamovi project* (2024). *jamovi* (Version 2.5) [Computer Software], o valor de Kappa para cada um dos quatro patógenos. Utilizando GraphPad Prism versão 10.0.0 para Windows, (GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA), foi possível realizar os testes de concordância e produzir os gráficos do trabalho.

4 RESULTADOS

4.1 SÍTIOS DE COLETA

O sítio de coleta anal representou a maior parcela das amostras 52,66% (79), já as amostras de orofaringe representaram um fragmento menor, 31,33% (47). Por último e menos representativa, estão as amostras de coleta uretral totalizando 14,67% (22) das amostras. Observando a positividade em cada sítio e com métodos diferentes podemos perceber que os resultados detectados de CT e NG mantiveram um padrão de detecção entre TMA e PCR em tempo real, variando, respectivamente, de 24,05% (19) e 20,25% (16) no sítio anal e de 12,77% (6) e 10,64% (5) na orofaringe, para amostras de CT. Já para as amostras de NG obteve-se uma variação de TMA para PCR em tempo real de 13,92% (11) para 10,13% (8) no sítio anal e de 27,65% para 21,28% no sítio oral respectivamente. Ainda para CT e NG, as amostras uretrais mantiveram exatamente o número de detecções nos dois métodos, 2 para CT e 1 para NG. MG apresentou a maior variação de detecção por sítio, no sítio oral obteve-se 14,89% (7) no TMA, já na PCR em tempo real há uma queda para 6,38% (3), no sítio uretral a diminuição foi ainda maior, de 18,18% (4) para 0, como podemos observar nas tabelas 1 e 2. Como será discutido a seguir a PCR em tempo real não detectou nenhuma amostra detectada para TV.

Tabela 1 Número de patógenos detectados pelo método de amplificação mediada por transcrição de acordo com o sítio de coleta das amostras.

Aptima – TMA						
Sítio	n	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Detectadas
Anal	79 (52,66%)	19 (24,05%)	11 (13,92%)	15 (18,99%)	1 (1,27%)	46
Oral	47 (31,33%)	6 (12,77%)	13 (27,65%)	7 (14,89%)	2 (4,25%)	28
Uretral	22 (14,67%)	2 (9,09%)	1 (4,54%)	4 (18,18%)	5 (22,73%)	12

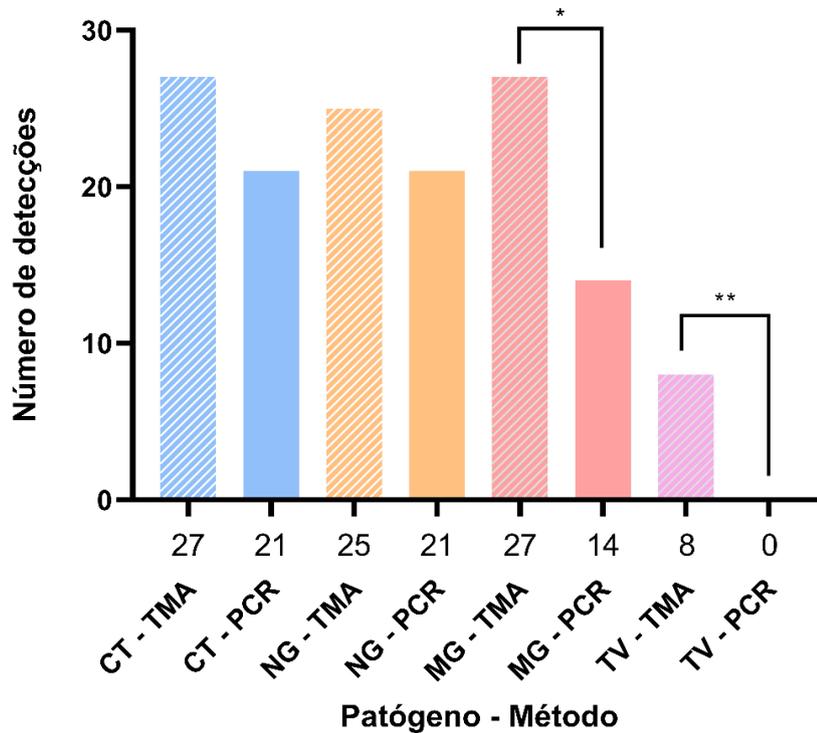
Tabela 2 Número de patógenos detectados pela PCR em tempo real de acordo com o sítio de coleta das amostras.

Allplex – PCR em tempo real						
Sítio	n	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Detectadas
Anal	79 (52,66%)	16 (20,25%)	8 (10,13%)	11 (13,92%)	0	35
Oral	47 (31,33%)	5 (10,64%)	10 (21,28%)	3 (6,38%)	0	18
Uretral	22 (14,67%)	2 (9,09%)	1 (4,54%)	0	0	3

4.2 DETECÇÃO DOS PATÓGENOS

Utilizando os testes *Aptima* (Hologic®) foi observado um total de 75 amostras detectadas para pelo menos um dos quatro patógenos, sendo essas 19 apenas para CT, 16 apenas para NG, 22 apenas para MG e 7 apenas para TV, totalizando 64 amostras detectadas para um único patógeno. Dentro deste quantitativo também foram encontradas coinfeções, sendo cinco entre CT e NG, uma entre CT e MG, uma entre CT e TV, três entre NG e MG e uma coinfeção entre CT, NG e MG. Utilizando o teste *Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®) houve algumas divergências em relação ao teste anterior e que serão discutidas adiante, 17 apenas para CT, 15 apenas para NG e 12 apenas para MG, totalizando, nesse caso 44 amostras detectadas para apenas um patógeno. Com esse teste foi possível observar algumas coinfeções, sendo essas, quatro para CT e NG e duas para NG e MG, como ilustrado na Figura 1.

Figura 3 Número de patógenos detectados de acordo com o método utilizado



Legenda: CT, *Chlamydia trachomatis*; NG, *Neisseria gonorrhoeae*; MG, *Mycoplasma genitalium*; TMA, Amplificação mediada por transcrição; PCR, Reação em cadeia da polimerase.

* $P < 0,05$ ($P = 0,0171$); ** $P < 0,05$ ($P = 0,0034$)

4.3 DESEMPENHO DOS TESTES

Nos testes com o *Kit Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®) foi possível observar uma especificidade de 98,4% para CT, 97,6% para NG e 100% para MG. Para os cálculos de sensibilidade foi observado um resultado menor em relação a especificidade, 70,4% para CT, 72% para NG e 51,9% para MG. Já para os valores do coeficiente Kappa, obteve-se 0,753 (forte) para CT, 0,744 (forte) para NG e 0,683 (forte) para MG, como ilustrado na Tabela 3. Para TV não foi possível calcular os valores de especificidade e sensibilidade, nem o coeficiente Kappa devido a inexistência de resultados detectados na PCR em tempo real.

Tabela 3 Desempenho do teste *Allplex™ CT/NGMG/TV assay*

Patógenos	Aptima	Allplex	Performance		
	Positividade		Sensibilidade	Especificidade	Kappa
<i>Chlamydia trachomatis</i>	27	21	70,4% (CI95%; 49,8 – 86,2)	98,4% (CI95%; 94,2 – 99,8)	0,753
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	25	21	72% (CI95%; 50,9 – 87,9)	97,6% (CI95%; 93,1 – 99,5)	0,744
<i>Mycoplasma genitalium</i>	27	14	51,9% (CI95%; 31,9 – 71,3)	100% (CI95%; 97,0 - 100)	0,638
<i>Trichomonas vaginalis</i>	8	0	-%	-%	0

Legenda: CI95%, intervalo de confiança de 95%.

4.4 DIVERGÊNCIAS NAS DETECÇÕES

Dentre as 35 divergências, 30 delas (85,7%) foram causadas por resultados negativos na PCR em tempo real e detectado pelo TMA. Cinco casos se destacam, sendo que em quatro deles é possível observar coinfeção, na qual a PCR em tempo real detectou apenas um dos patógenos previamente detectados no TMA, qualificando, ainda assim, uma divergência por negatividade. Para os resultados discordantes positivos a PCR em tempo real detectou em cinco ocasiões (14,3%) patógenos não detectados pelo TMA.

Tabela 4 Resultados divergentes por positividade

Amostra	Aptima	Allplex
Uretral	CT	NG
Oral (1)	NG	CT NG
Oral (2)	MG	NG MG
Oral (3)	MG	NG MG
Oral (4)	NG	CT NG

Legenda: CT, *Chlamydia trachomatis*; NG, *Neisseria gonorrhoeae*; MG, *Mycoplasma genitalium*.

5 DISCUSSÃO

Observamos que durante a etapa de extração algum tipo de incompatibilidade ocorreu entre o *Kit ReliaPrep™ gDNA Blood Miniprep System* (Promega®) e o meio de transporte do *Aptima Multitest Swab Specimen Collection Kit* (Hologic®). Esta hipótese se deve ao fato de quando os reagentes de empresas diferentes entraram em contato foi possível observar a formação de emaranhados, possivelmente proteicos, e possivelmente ocasionados por uma mudança brusca de pH do meio. O grande problema da formação destes emaranhados está relacionado, principalmente, ao tipo de extração realizada, por colunas. Em colunas que possuem um grande número desses emaranhados é possível que haja o entupimento das colunas, ou em certos casos até mesmo seu rompimento, impossibilitando que o material genético seja extraído corretamente. Percebemos que quanto mais tempo as amostras ficam em contato com os reagentes, maior a quantidade de emaranhados formados. Com isso em mente, a extração foi realizada utilizando um pequeno número de amostras simultâneas, buscando manter um ritmo acelerado para que as amostras não ficassem totalmente impossibilitadas de passar a membrana de sílica das colunas.

Nove amostras, dentre as 75 detectadas, não amplificaram o controle interno na PCR multiplex (Seegene®) mostrando uma possível falha na etapa de extração e precisaram ter suas extrações repetidas. Em muitos casos é possível que apenas uma pequena quantidade de material extraído tenha conseguido passar para a coluna e por isso é possível que resultados negativos no teste *Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®) tenham sofrido efeito dessa pequena quantidade de material extraído, não sendo sensível o suficiente para detectar os patógenos apesar do teste ainda conseguir amplificar e detectar os controles internos dessas amostras. Mesmo nas amostras detectadas ainda foi possível observar um valor de Ct (do inglês, cycle threshold, ou limite de detecção) alto. Contudo, os fabricantes deixam claro que a comparação semiquantitativa entre metodologias não pode ser feita.

No geral, não seria esperado qualquer tipo de erro por positividade utilizando o teste *Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®), já que os testes utilizados no equipamento automatizado *Panther Systems* (Hologic®) são os mais sensíveis e considerados o padrão ouro para detecção de ISTs (Unemo et al., 2013).

Hadad e colaboradores (2019) observaram uma falha na detecção de CT pelo sistema *Aptima combo 2* (Hologic®) na Dinamarca em 2019. O estudo citado avaliou a possibilidade de uma nova variante de CT encontrada na Europa ter causado resultados falso negativos na

população estudada. A variante em questão, Fl-nvCT, possui uma mutação no rRNA 23S (G1523A), o qual também é o alvo utilizado pelo teste *Aptima combo 2* (Hologic®). Para avaliar os possíveis resultados falso negativos, Haddad e colaboradores utilizaram outro teste da mesma empresa, o *Aptima Chlamydia trachomatis* (Hologic®), o qual utiliza ao invés do gene que pode ter a mutação, orRNA 16S como alvo. Dentre todos os resultados falso negativos do estudo 95% deles foram confirmados com a mutação na subunidade 23S do rRNA. (Hadad *et al.*, 2020). Em nosso estudo duas das cinco divergências ocorreram pela detecção de CT no teste *Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®), o qual possui alvo diferente, mas não divulgado pelo fabricante, do alvo utilizado pelo *Aptima combo 2* (Hologic®). Dessa forma é possível que estivéssemos diante de alguma variante de CT (que não conseguimos atestar por não termos sequenciado o gene) que não foi detectada pelo teste inicial. Importante salientar a improbabilidade de estarmos lidando com a mesma variante do estudo dinamarquês, uma vez que tal variante nunca foi encontrada no Brasil. Contudo, outras variantes detectadas na Europa, também apresentaram um padrão parecido de resultados falso negativo (Hadad *et al.*, 2020), corroborando com a possibilidade de resultados falso positivos pelo teste *Aptima combo 2* (Hologic®).

Nenhuma das oito amostras detectadas para TV pela metodologia TMA manteve o status de detectada quando houve a repetição com o teste *Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®) e por isso a análise estatística foi desconsiderada, uma vez que é impossível calcular tanto a sensibilidade quanto a especificidade para TV, assim como o coeficiente Kappa. Existem algumas hipóteses que tentam explicar o que aconteceu nessas amostras em conjunto com a menor sensibilidade do teste da Seegene®. Como comentado anteriormente, a etapa de extração por colunas foi bastante dificultada pela incompatibilidade dos meios de transporte *Aptima Multitest Swab Specimen Collection Kit* (Hologic®) com o *Kit ReliaPrep™ gDNA Blood Miniprep System* (Promega®) de extração. A possível diminuição da quantidade de material extraído em conjunto com a menor sensibilidade do teste *Allplex™ CT/NG/MG/TV Assay* (Seegene®) pode ter resultado na impossibilidade de detecção do patógeno. Ressaltamos que essas amostras foram todas repetidas, buscando minimizar os problemas observados na extração, contudo não foi realizada a dosagem do material genético para confirmar essa possível pequena quantidade de DNA extraído.

O rastreio é uma prática conhecida há muitos anos e com importância imensa em diversos momentos da história. A infecção pelo HIV e a sífilis, por exemplo, podem passar por períodos em que a sintomatologia clínica é basicamente inexistente, nesses casos é de extrema

importância que qualquer pessoa com comportamento de risco ou exposição, mesmo que momentaneamente, seja testada. O diagnóstico precoce é extremamente importante, uma vez que a evolução destas duas infecções trazer consequências de morbimortalidade para pacientes e no caso de gestantes, também aos seus conceitos (Alexander, 2016; Nishiya *et al.*, 2022). Existem alguns pontos importantes a serem elencados. Atualmente, dentre os principais benefícios do rastreio estão a possibilidade de iniciar imediatamente o tratamento, prevenindo o desenvolvimento de uma doença, bem como a possibilidade de minimizar o contágio, principalmente quando o assunto são ISTs. (Dalby; Stoner, 2022). O presente estudo procurou rastrear pessoas assintomáticas, especialmente aquelas com maior exposição ou em Profilaxia Pré-Exposição (PrEP) para ter um cenário de frequência de eventuais portadores assintomáticos por sítio anatômico, visto que em grande parte dos atendimentos a abordagem etiológica não é feita em pessoas assintomáticas, em virtude da nossa pouca experiência de rastreio em ISTs. (Kissinger, 2015b).

Para as detecções nos sítios extragenitais, Kogler e colaboradores (2024) avaliaram um total de 440 amostras de homens e mulheres e obtiveram uma maior detecção de NG tanto para as amostras de orofaringe, quanto para as amostras retais (Kogler *et al.*, 2024). Já o presente estudo obteve resultados parcialmente diferentes. Obtivemos um maior número de detecções de CT em amostras retais, enquanto para as amostras orais, NG foi o patógeno de maior destaque.

Salazar e colaboradores (2019) testaram um total de 622 amostras em 2017, buscando comparar os resultados entre os testes *Aptima assay* (Hologic®) e *Allplex assay* (Seegene®), assim como o presente trabalho se propôs a fazer, contudo, Salazar e colaboradores (2019) utilizaram um teste diferente, *Allplex™ STI Essential Assay*, o qual detecta *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis*. Ademais, quando a coleta de amostras foi realizada já foi preparada para ser submetida aos dois testes, diferentemente do que ocorreu no presente trabalho, no qual as amostras já haviam sido testadas no equipamento automatizado *Panther systems* e alguns meses depois foram testadas em PCR em tempo real. Analisando o desempenho dos testes, quando comparamos os dados obtidos em nosso estudo com dados de Salazar e colaboradores (2019) o valor de sensibilidade e especificidade para NG foi semelhante comparando-os entre si, 72,4% (CI95%; 52,5 – 86,6) de sensibilidade e 100,0% (99,2 - 100) de especificidade para Salazar e colaboradores (2019) enquanto no presente estudo obteve-se 72% (CI95%; 50,9 – 87,9) de sensibilidade e 97,6% (CI95%; 93,1 – 99,5) de especificidade (De Salazar *et al.*, 2019). Importante ressaltar que no estudo mencionado

anteriormente não foram relatados os problemas relacionados à etapa de extração, uma vez que quando as coletas foram realizadas, já foram armazenadas separadamente em meios diferentes para cada processo, TMA e PCR em tempo real. Para CT a sensibilidade e especificidade observadas apresentaram uma diferença maior quando comparada a Salazar e colaboradores (2019). Os valores observados foram de 70,4% (CI95%; 49,8 – 86,2) para sensibilidade e 98,4% (CI95%; 94,2 – 99,8) para especificidade enquanto De Salazar e colaboradores (2019) encontraram sensibilidade de 83,8% (CI95%; 67,3–93,2) e especificidade 100,0% (CI95%; 99,2–100). Apesar dos dados de performance, sensibilidade e especificidade, terem pequenas semelhanças ambos se destacam pela diferença do *Score* estatístico Kappa que para CT e NG foi de 0,753 e 0,744 respectivamente, consideravelmente menores que os *scores* obtidos pelo estudo de Salazar e colaboradores (2019), sendo 0,910 e 0,830 respectivamente. O coeficiente Kappa nos mostra o grau de concordância entre avaliadores, embora seja um teste limitado por não considerar outros fatores como a relevância individual de cada resultado. Neste caso é o ideal, uma vez que comparamos os resultados de um avaliador (PCR em tempo real) em relação aos obtidos pelo avaliador de referência (TMA). Essa grande diferença de coeficiente Kappa deve-se principalmente pelos resultados falso positivos, os quais possuem um impacto maior no cálculo que resultados verdadeiro negativo (De Salazar *et al.*, 2019; Galan *et al.*, 2003).

Para MG obtivemos o menor valor geral de sensibilidade 51,9% (CI95%; 31,9 – 71,3) e o maior valor geral de especificidade 100% (CI95%; 97,0 - 100), resultando no coeficiente Kappa geral mais baixo (excluindo TV que foi inexistente). Outro destaque para as amostras de MG, como pode ser observado no Anexo A, foi o menor número de resultados falso positivos (0) e o maior número de resultados falso negativos (13), valores que ocupam extremos em comparação com os outros três patógenos como demonstram os quadros 2, 3 e 4. Comparando ainda com o estudo de Salazar e colaboradores (2019) percebemos que para esses autores o menor valor de Kappa (0,580) e o menor valor de sensibilidade (41,7%) também foi encontrado para MG (De Salazar *et al.*, 2019).

Em relação à importância da utilização de testes ainda mais sensíveis, não somente para detectar amostras perdidas por outros testes em pessoas sintomáticas, mas também para detecção em pessoas assintomáticas. Outro estudo, realizado na Dinamarca em 2016, mostra a significância estatística de utilizar testes baseados no TMA para busca de MG em homens e mulheres em relação a PCR, foi observado uma perda de 55 amostras detectadas, de um total de mil duzentas e quarenta e cinco (1.245) pessoas, das quais apenas 26 eram sintomáticas

(Salado-Rasmussen *et al.*, 2022). Um estudo de caso realizado no ano de 2024 na Universidade Federal de Santa Catarina traz informações que corroboram com a importância destes testes.

6. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente trabalho observamos que a PCR em tempo real obteve valores de sensibilidade e especificidade piores em relação ao TMA em todos os patógenos, contudo, levando em conta que pessoas em um estudo de rastreamento estão assintomáticas, é possível que a PCR em tempo real ainda possa ser utilizada como método de rastreamento de ISTs, principalmente em países com menor aporte financeiro e consequente dificuldade para obter o equipamento automatizado e os testes padrão ouro. Por se tratar de um único teste, ao invés de três como no TMA realizado pelo equipamento automatizado, a PCR em tempo real pode ser consideravelmente mais barata, além de ter como necessidade um equipamento mais comumente encontrado em laboratórios ao redor do mundo, o termociclador.

É possível que alguns resultados tenham sofrido influência direta das dificuldades encontradas na etapa de extração. Este achado chama atenção da possível intercambialidade entre os meios de conservação do material genético entre as metodologias, fato que pode comprometer o desempenho dos testes. Talvez um futuro estudo, deva de partida já separar as amostras na coleta, utilizando o kit de conservação de amostra estabelecido pelo fabricante do teste. Outro ponto importante a ser considerado em futuros trabalhos está na possibilidade de agregar um terceiro método, que possa servir como desempate, visando melhorar a certeza dos resultados.

Este estudo apresentou algumas limitações, como uma amostragem relativamente pequena e a falta de um terceiro teste confirmatório para que fosse possível assegurar a falha ou acerto dos testes baseados em PCR. É possível que futuros estudos possam resolver essas limitações.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, Thomas S. Human Immunodeficiency Virus Diagnostic Testing: 30 Years of Evolution. **Clinical and Vaccine Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 249–253, 2016.
- BACHMANN, Laura H. *et al.* **Trichomonas vaginalis genital infections: Progress and challenges**. [S. l.: s. n.], 2011.
- BAUMANN, Lukas *et al.* Prevalence of Mycoplasma genitalium in different population groups: systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, [s. l.], v. 94, n. 4, p. 255–262, 2018.
- BIRKELUND, Svend; LUNDEMOSE, Anker G; CHRISTIANSEN, Gunna. **Immunoelectron Microscopy of Lipopolysaccharide in Chlamydia trachomatis** INFECTION AND IMMUNITY. [S. l.: s. n.], 1989. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/iai>.
- BJDRNELLUS, Eva *et al.* **Mycoplasma genitalium in non-gonococcal urethritis—a study in Swedish male STD patients** International Journal of STD & AIDS. [S. l.: s. n.], 2000.
- BLACK, Carolyn M. **Current Methods of Laboratory Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections**. [S. l.: s. n.], 1997. Disponível em: <http://cmr.asm.org/>.
- BLAIR, Cherie S. *et al.* Factors associated with repeat rectal Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis screening following inconclusive nucleic acid amplification testing: A potential missed opportunity for screening. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 12, 2019.
- CANENE-ADAMS, Kirstie. General PCR. In: METHODS IN ENZYMOLOGY. [S. l.]: Academic Press Inc., 2013. v. 529, p. 291–298.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs)**. [S. l.], 2023a.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Sexually Transmitted Diseases (STDs)**. [S. l.], 2023b.
- CHUN, Jong Yoon *et al.* Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 35, n. 6, 2007.
- CHUN, Jong-Yoon; LEE, Dae-Hoon; HWANG, In Taek. Seegene Bulletin: The science and business of molecular diagnostics. **Seegene Bulletin**, [s. l.], v. 1, p. 1–16, 2012.
- COHEN, Craig R. *et al.* Mycoplasma genitalium infection and persistence in a cohort of female sex workers in Nairobi, Kenya. **Sexually Transmitted Diseases**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 274–279, 2007.
- DALBY, Jessica; STONER, Bradley P. Sexually Transmitted Infections: Updates From the 2021 CDC Guidelines. **American Family Physician**, [s. l.], v. 105, n. 5, p. 514–520, 2022.

DE SALAZAR, Adolfo *et al.* Comparison between Aptima Assays (Hologic) and the Allplex STI Essential Assay (Seegene) for the diagnosis of Sexually transmitted infections. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 9, 2019.

DOMINGUES, Carmen Silvia Bruniera *et al.* Brazilian protocol for sexually transmitted infections 2020: Epidemiological surveillance. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 54, 2021.

EDWARDS, Thomas *et al.* **Trichomonas vaginalis: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd, 2016.

FREJ-MĄDRZAK, Magdalena *et al.* **Irena Choroszy-Król A-F Characteristics of the Chlamydia trachomatis species-Immunopathology and Infections Charakterystyka gatunku Chlamydia trachomatis-immunopatologia i zakażenia**. [S. l.: s. n.], 2012.

GALAN, Márcia *et al.* **Avaliando a confiabilidade interavaliadores de um instrumento para classificação de pacientes - coeficiente KappaRev Esc Enferm USP**. [S. l.: s. n.], 2003.

GASPAR, Pâmela Cristina *et al.* Gonorrhoea prevalence in adults in Brazil: Spectrum-STI trend estimation, 2000–2020. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 56, 2023.

GNANADURAI, Roshina; FIFER, Helen. **Mycoplasma genitalium: A review**. [S. l.]: Microbiology Society, 2020.

HADAD, Ronza *et al.* A Chlamydia trachomatis 23S rRNA G1523A variant escaping detection in the Aptima Combo 2 assay (Hologic) was widespread across Denmark in July–September 2019. **APMIS**, [s. l.], v. 128, n. 6, p. 440–444, 2020.

HARP, Djana F.; CHOWDHURY, Indrajit. **Trichomoniasis: Evaluation to execution**. [S. l.]: Elsevier Ireland Ltd, 2011.

HARSHITHA, Ravikumar; ARUNRAJ, Duraipandian Rex. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, [s. l.], v. 49, n. 5, p. 800–812, 2021.

HEID, Christian A *et al.* **Real Time Quantitative PCR**. [S. l.: s. n.], 1996.

ISON, Catherine A.; DEAL, Carolyn; UNEMO, Magnus. Current and future treatment options for gonorrhoea. **Sexually Transmitted Infections**, [s. l.], v. 89, n. SUPPL. 4, 2013.

JANSEN, Klaus *et al.* STI in times of PrEP: High prevalence of chlamydia, gonorrhoea, and mycoplasma at different anatomic sites in men who have sex with men in Germany. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2020.

KAUNITZ, Jonathan D. **The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power**. [S. l.]: Springer New York LLC, 2015.

KELLY, Helen *et al.* **Systematic reviews of point-of-care tests for the diagnosis of urogenital Chlamydia trachomatis infections**. [S. l.: s. n.], 2017.

KISSINGER, Patricia. **Epidemiology and Treatment of Trichomoniasis**. [S. l.]: Current Medicine Group LLC 1, 2015a.

KISSINGER, Patricia. **Trichomonas vaginalis: A review of epidemiologic, clinical and treatment issues**. [S. l.]: BioMed Central Ltd., 2015b.

KOGLER, A. *et al.* Prevalence of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and Mycoplasma genitalium at pharyngeal and anorectal sites in patients presenting to an STI outpatient ward. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [s. l.], 2024.

KREISEL, Kristen M. *et al.* Sexually Transmitted Infections Among US Women and Men: Prevalence and Incidence Estimates, 2018. **Sexually transmitted diseases**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 208–214, 2021.

LEE, Young Jo *et al.* Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 4, 2014.

MADDOCKS, Sarah; JENKINS, Rowena. **Understanding PCR: a practical bench-top guide**. [S. l.: s. n.], 2016. v. 1

MCGOWIN, Chris L.; ANDERSON-SMITS, Colin. **Mycoplasma genitalium: An Emerging Cause of Sexually Transmitted Disease in Women**. [S. l.: s. n.], 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: Hepatites Virais 2022**. [S. l.: s. n.], 2022a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: HIV/AIDS 2022**. [S. l.: s. n.], 2022b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim epidemiológico: Sífilis 2022**. [S. l.: s. n.], 2022c.

NAVARRO, E. *et al.* **Real-time PCR detection chemistry**. [S. l.]: Elsevier, 2015.

NISHIYA, Anna S. *et al.* Transfusion-Acquired HIV: History, Evolution of Screening Tests, and Current Challenges of Unreported Antiretroviral Drug Use in Brazil. **Viruses**, [s. l.], v. 14, n. 10, 2022.

PAN-AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Gonorrhea**. [S. l.], 2018.

PATEL, Eshan U. *et al.* Prevalence and correlates of trichomonas vaginalis infection among men and women in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 211–217, 2018.

PETRIN, Dino *et al.* **Clinical and Microbiological Aspects of Trichomonas vaginalis**. [S. l.: s. n.], 1998. Disponível em: <http://cmr.asm.org/>.

PHILLIPS, Jennan A. **Chlamydia Infections**. [S. l.]: SAGE Publications Inc., 2019.

POOLE, Danielle N.; MCCLELLAND, R. Scott. **Global epidemiology of Trichomonas vaginalis**. [S. l.: s. n.], 2013.

ROWLEY, Jane *et al.* Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: Global prevalence and incidence estimates, 2016. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 97, n. 8, 2019.

SAIKI, Randall K *et al.* **Enzymatic Amplification of α -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia**. [S. l.: s. n.], 1985. Disponível em: <https://www.science.org>. .

SALADO-RASMUSSEN, Kirsten *et al.* Clinical Importance of Superior Sensitivity of the Aptima TMA-Based Assays for Mycoplasma genitalium Detection. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 4, 2022.

SHETTY, Seema *et al.* **Diagnosis of Chlamydia trachomatis genital infections in the era of genomic medicine**. [S. l.]: Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2021.

SINGH, Charanjeet; ROY-CHOWDHURI, Sinchita. Quantitative real-time PCR: Recent advances. *In*: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. [S. l.]: Humana Press Inc., 2016. v. 1392, p. 161–176.

TAO, Yile *et al.* Comparison of analytical sensitivity and efficiency for SARS-CoV-2 primer sets by TaqMan-based and SYBR Green-based RT-qPCR. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 106, n. 5–6, p. 2207–2218, 2022.

TAYLOR-ROBINSON, David. **The discovery of Chlamydia trachomatis**. [S. l.]: BMJ Publishing Group, 2017.

UNEMO, magnus *et al.* **Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana**. [S. l.: s. n.], 2013.

UNEMO, Magnus *et al.* Gonorrhoea. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2019.

UNEMO, Magnus *et al.* WHO global antimicrobial resistance surveillance for Neisseria gonorrhoeae 2017–18: a retrospective observational study. **The Lancet Microbe**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. e627–e636, 2021.

UNEMO, Magnus; GOLPARIAN, Daniel; EYRE, David W. Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae and Treatment of Gonorrhea. *In*: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. [S. l.]: Humana Press Inc., 2019. v. 1997, p. 37–58.

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

WALENSKY, Rochelle P *et al.* **Morbidity and Mortality Weekly Report Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021 Centers for Disease Control and Prevention MMWR Editorial and Production Staff (Serials) MMWR Editorial Board**. [S. l.: s. n.], 2021.

WERNECKE, M.; MULLEN, C. Molecular Biology: Molecular Biology in Microbiological Analysis. *In: ENCYCLOPEDIA OF FOOD MICROBIOLOGY: SECOND EDITION*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2014. p. 808–814.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health sector strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022-2030**. [S. l.: s. n.], 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sexually transmitted infections (STIs)**. [S. l.], 2022.

WROBLEWSKI, Jennifer K.H. *et al.* Comparison of transcription-mediated amplification and PCR assay results for various genital specimen types for detection of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 3306–3312, 2006.

ANEXO A – COMPARATIVOS DOS RESULTADOS DE CADA TESTE POR PATÓGENO

Quadro 1 Comparativo de resultados de *Mycoplasma genitalium* entre os testes

<i>Mycoplasma genitalium</i>		PCR em tempo real		Total
		Positivo	Negativo	
TMA	Positivo	14	13	27
	Negativo	0	123	123
Total		14	136	150

Quadro 2 Comparativo de resultados de *Chlamydia trachomatis* entre os testes

<i>Chlamydia trachomatis</i>		PCR em tempo real		Total
		Positivo	Negativo	
TMA	Positivo	19	8	27
	Negativo	2	122	124
Total		21	130	151

Quadro 3 Comparativo de resultados de *Neisseria gonorrhoeae* entre os testes

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>		PCR em tempo real		Total
		Positivo	Negativo	
TMA	Positivo	18	7	25
	Negativo	3	122	125
Total		21	129	150

Quadro 4 Comparativo de resultados de *Trichomonas vaginalis* entre os testes

<i>Trichomonas vaginalis</i>		PCR em tempo real		Total
		Positivo	Negativo	
TMA	Positivo	0	8	8
	Negativo	0	142	142
Total		0	150	150

