

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CARLOS DANIEL PASSOS LOBO

**DETECÇÃO DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS POR PCR EM TEMPO REAL EM
UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO FEMININA DE MACEIÓ ATENDIDA EM
SERVIÇOS DE SAÚDE PRIVADOS E PÚBLICOS.**

MACEIÓ

2011

CARLOS DANIEL PASSOS LOBO

**DETECÇÃO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* POR PCR EM TEMPO REAL EM
UMA AMOSTRA DA POPULAÇÃO FEMININA DE MACEIÓ ATENDIDA EM
SERVIÇOS DE SAÚDE PRIVADOS E PÚBLICOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção de grau de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luíz Antônio Ferreira Da
Silva

MACEIÓ

2011

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

L799d Lobo, Carlos Daniel Passos.
Detecção de *Chlamydia trachomatis* por PCR em tempo real em uma amostra da população feminina de Maceió atendida em serviços de saúde privados e públicos / Carlos Daniel Passos Lobo . – 2011.
58 f. : il., tabs., grafs.

Orientador: Luíz Antônio Ferreira da Silva.
Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 48-53.
Apêndice: f. 54.
Anexos: f. 55-58.

1. *Chlamydia trachomatis*. 2. Real time PCR. 3. Prevalência. 4. Doenças sexualmente transmissíveis – Maceió (AL). 5. Saúde da mulher. I. Título.

CDU: 616.97(813.5)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Defesa da Dissertação de Mestrado do aluno Carlos Daniel Passos Lobo: "Detecção de *Chlamydia Trachomatis* por PCR em tempo real em uma amostra da população feminina de Maceió atendidas em serviços de saúde privados e públicos". orientado pelo Prof. Luiz Antônio Ferreira da Silva, apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 09 de Dezembro de 2011.

Os membros da Banca Examinadora, consideraram o candidato APROVADO

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto

Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho

Prof. Dr. Dalmo de Almeida Azevedo

Dedico este trabalho aos meus filhos Arthur Daniel e Henrique pelo seu amor, carinho e compreensão. A minha esposa Ellen pelo seu incentivo, paciência e compreensão em todos os momentos. Amo vocês!

Aos meus queridos pais e irmã, pela família, educação e compreensão nos momentos de minha ausência durante este período.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, saúde, força de vontade e oportunidade de aprender.

Ao Prof. Dr. Luiz António Ferreira da Silva, professor e orientador, por ter acreditado neste trabalho, pelo apoio incondicional, dedicação e ensinamentos durante esta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por esta oportunidade e aos professores deste PPG pelos ensinamentos.

Às mulheres participantes do estudo, pois sem elas este trabalho não seria possível.

Aos profissionais que integram o ambulatório de ginecologia e colposcopia do PAM-Salgadinho, em especial à Dra. Vera, Dra. Iolanda, Dra. Vânia e Enf. Katia, que mesmo na rotina do dia-a-dia contribuíram de maneira indispensável para realização desta pesquisa.

À minha tia Dra. Anália Lobo, por acreditar e pelo seu indispensável apoio nesta caminhada.

Ao amigos: Dr. Jorge, Dr. Antônio Morais e Dra. Edja pelo incentivo e colaboração deste trabalho.

Ao Laboratório Alvaro, pela doação de algumas amostras positivas para realização dos exames, especialmente Lilian de Assis, que sempre esteve disponível.

Ao Prof. MSc. Benisio Filho, por ter me iniciado no mundo da biologia molecular, colaboração e dedicação em todos os momentos.

Ao Dr. Jacinto Costa, pelo estímulo e amizade.

Ao Dr. Dalmo Azevedo pela inestimável colaboração com os dados estatísticos, o meu muito obrigado.

Ao estagiários: Camila e Junior pelo auxílio no laboratório, demonstrando competência e interesse por novas técnicas.

Aos meus amigos do laboratório Gustavo Reis, Iede Emeréciano Ferreira da Silva, Djavan David, Moezio Vasconcellos, Alexandro Manguiera, Antônio Carlos pela colaboração e ajuda no momento certo.

À minha família, pelo incentivo e apoio, sempre.

Certeza

De tudo ficaram três coisas:
a certeza de que estamos sempre
começando...
a certeza de que é preciso continuar...
a certeza de que seremos
interrompidos
antes de terminar...

Façamos da interrupção um caminho
novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

RESUMO

As infecções sexualmente transmissíveis são relativamente freqüentes e constituem sério problema de saúde pública, em quase todo mundo. A *Chlamydia trachomatis* é o microrganismo responsável por mais da metade dos casos de uretrite não-gonocócica, bem como de inúmeros casos de cervicites. Seu comportamento que se caracteriza na maioria das vezes pela ausência de sintomas, é motivo de grande preocupação, principalmente pelas sequelas que pode causar, como a infertilidade nas mulheres. Na maioria dos países em desenvolvimento não existem dados de incidência ou prevalência por *Chlamydia trachomatis* de caráter nacional. Por isto, habitualmente, os programas nacionais trabalham com estimativas obtidas de outros países e regiões do mundo, providas fundamentalmente, pela organização mundial de saúde. Por falta de informações mais precisas do Brasil e principalmente do Estado de Alagoas, este trabalho teve como objetivo detectar a *Chlamydia trachomatis* por PCR em tempo real na população feminina de Maceió. Foi utilizada como metodologia a detecção de clamídia por PCR em tempo real em 514 amostras cervico-vaginais. Os resultados mostraram uma incidência de 4,08% de amostras positivas para *Chlamydia trachomatis* que mulheres entre 26 e 35 anos apresentam uma prevalência maior de infecção por clamídia, apresentando uma prevalência no período de estudo de 4,08%. Foi observado também que não há relação entre os achados clínicos como ardor vaginal e corrimento com a presença obrigatória de clamídia sendo significativos apenas, os resultados da colposcopia, que, na grande maioria das vezes em que estavam alteradas a PCR era positiva. O número de resultados positivos em amostras coletadas no serviço público é bem superior a do serviço particular. Os resultados da prevalência nos levam a concluir que há uma relação entre a situação sócio-econômica e a infecção por Clamídia, uma vez que as mulheres da cidade de Maceió atendidas no posto de atendimento médico Salgadinho não possuem condições financeiras para serem atendidas em clínicas particulares.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis*. Rreal time PCR. Prevalência

ABSTRACT

Sexually transmitted infections are relatively frequent and constitute a serious public health problem in almost everyone. *Chlamydia trachomatis* is the organism responsible for more than half the cases of nongonococcal urethritis, as well as numerous cases of cervicitis. Their behavior is characterized mostly by the absence of symptoms, is of great concern, especially for sequels that can cause, such as infertility in women. In most developing countries there are no data on incidence or prevalence of *Chlamydia trachomatis* national character. Therefore, usually, work with national estimates from other countries and regions worldwide, provided mainly by the World Health Organization. For lack of more precise information mainly from Brazil and the State of Alagoas, this study aimed to verify the actual incidence of *Chlamydia trachomatis* infection in Maceió, and relate to the clinical, cytological and colposcopic so that you demonstrated the importance of their screening, encouraging this approach in favor of women's health. Methodology was used as the detection of chlamydia by real-time PCR in 514 samples and sensitivity and specificity were increased, providing meaningful data. The results showed that women between 20 and 35 years have a higher prevalence of chlamydial infection, with a prevalence in the study period of 4.08%. We also observed that there is no relationship between clinical and vaginal discharge and burning with the obligatory presence of chlamydia was only significant, the results of colposcopy, wich in most cases they were changed was PCR positive. The number of positive results on samples collected in the public service is far superior to the particular service. The prevalence results leads us to conclude that there is a relationship between socioeconomic status and chlamydia infection, since the women of the city of Maceió trated at medical services salgadinho not have financial conditions to be met in private clinics.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*. Real time PCR. Prevalence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de desenvolvimento da <i>C. Trachomatis</i>	21
Figura 2 - Fotografia do gel de agarose corado com brometo de etídio corado com brometo de etídio em 1) Marcador de peso molecular 100pb; 3) controle positivo, 4,5,6,7 e 8) Amostras positivas; 9) Controle Negativo; 2 e 10 poços vazios.....	34
Figura 3 - Gráfico representativo da curva de amplificação.....	35
Figura 4 - Gráfico representativo das curvas de dissociação indicando positividade. A temperatura de 75°C indica que o amplicon gerado na reação de PCR em tempo real de acordo com sua sequência é de <i>C. trachomatis</i>	36
Figura 5 - Gráfico representativo das curvas de dissociação indicando positividade em uma das amostras e ausência de amplicons nas demais (amostras negativas).....	36
Figura 6 - Proporções de <i>C. trachomatis</i> no período de Março a Dezembro de 2010.....	37
Figura 7 - Posição geográfica do estado de Alagoas no Brasil e a distância entre Maceió e União dos Palmares.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Doenças humanas causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i>	24
Tabela 2 - Exames solicitados no Brasil para diagnóstico laboratorial de <i>Chlamydia trachomatis</i>	26
Tabela 3 - Correlação dos resultados positivos da PCR com as seguintes variáveis: idade, uso de anticoncepcionais, história de DST, nº de parceiros, alterações colpocópicas e citológicas.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -Número de casos positivos de <i>C. trachomatis</i> em pacientes assintomáticas e sintomáticos encontrados na rede pública e privada.....	38
Gráfico 2 - Número de casos positivos encontrados nos serviços ginecológicos das redes pública privado e privada.....	40

LISTA DE ABREVIações

AIDS -	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATP -	Adenosina Trifosfato
°C -	graus Celsius
DIP -	Doença inflamatória pélvica
DNA -	Acido Desoxirribonucléico
dNTP -	Desoxinucleosideo trifosfato
DST -	Doença sexualmente transmissíveis
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g -	Unidade de centrifugação
gl -	Grau de liberdade
HCl -	Cloreto de Sódio
IC -	Intervalo de confiança
LCR -	Reação em Cadeia da Ligase
MagCl₂ -	Cloreto de Magnésio
mg -	miligramas
mM -	milimolar
Mmol/l -	Milimolar por litro
OR -	<i>odds ratio</i>
PB -	pares de base
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol -	picomol
RNA -	Ácido Ribonucléico

rRNA - Ácido Ribonucléico ribossomal

Taq - *Thermus aquaticus*

TE - Tris + EDTA

Tris - Tris(hidroxi-meti) aminometano

μl - microlitros

μM - micromol

X² - Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Biologia Celular.....	18
2.2	Ciclo de Desenvolvimento da <i>C. Trachomatis</i>	20
2.3	Genômica, Composição Química e Antigênica da <i>C. Trachomatis</i>	22
2.4	Processo Infeccioso Comumente Associado com Sorotipos de <i>C. Trachomatis</i>	23
2.5	Manifestações Clínicas das Principais Doenças Causadas pela <i>C. Trachomatis</i>	25
2.6	Diagnóstico Laboratorial de <i>C. Trachomatis</i>	25
2.7	Diagnóstico Molecular de <i>C. Trachomatis</i>	26
2.8	Epidemiologia e Distribuição da <i>C. Trachomatis</i>	27
2.9	Tratamento.....	28
3	OBJETIVOS.....	30
3.1	Objetivo Geral.....	30
3.2	Objetivo Específico.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Amostra.....	31
4.1.1	Características Gerais da Amostra.....	31
4.1.2	Critérios de Inclusão na Amostra.....	31
4.1.3	Formação da Amostra.....	31
4.2	Detecção do Material de <i>C. Trachomatis</i>	32
4.2.1	Extração de DNA total da amostra.....	32
4.2.2	Reação de Amplificação.....	32
4.2.3	Análise do produto de amplificação em PCR em tempo real.....	33
4.2.4	Análise Estatística.....	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	Detecção de <i>C. Trachomatis</i> em Amostras cérvico-Vaginais em Gel de Agarose 2%.....	34
5.2	Detecção de <i>C. Trachomatis</i> em Amostras cérvico Vaginais por PCR em Tempo Real.....	35
5.3	Prevalência de <i>C. Trachomatis</i> na Amostra Estudada.....	37
5.4	Número de Casos Positivos de <i>C. Trachomatis</i> em Pacientes Assintomáticas e Sintomáticas.....	37

5.5	Correlação entre os Resultados Positivos de PCR com Idade, Uso de Anticoncepcionais, História de DST, Número de Parceiros, Alterações Colposcópicas e Alterações Citológicas.....	38
5.6	Comparação da Positividade entre Amostras do Serviço Ginecológico Público e Privado.....	39
6	DISCUSSÃO.....	41
6.1	Detecção de <i>C. Trachomatis</i> em Amostras Cérvico - Vaginais em Gel de Agarose 2%.....	41
6.2	Detecção de <i>C. Trachomatis</i> em Amostras Cérvico - Vaginais por PCR em Tempo Real.....	42
6.3	Prevalência de <i>C. Trachomatis</i> na Amostra Estudada.....	43
6.4	Número de Casos Positivos de <i>C. Trachomatis</i> em Pacientes Assintomáticas e Sintomáticas e a Correlação com o Histórico Analisado de Cada Paciente.....	45
7	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICES.....	54
	ANEXOS.....	55

1 INTRODUÇÃO

As Clamídias são bactérias gram-negativas, imóveis e parasitas intracelulares obrigatórias. Em função do parasitismo obrigatório foram consideradas por muito tempo como vírus (SCHACHTER et al., 1995).

Atualmente, a *Chlamydia trachomatis* é responsável pelo maior número de casos de infecções bacterianas sexualmente transmissíveis. Seu comportamento que se caracteriza na maioria das vezes pela ausência de sintomas, é motivo de grande preocupação, principalmente pelas sequelas que pode causar. Infecta homens e mulheres, porém é nas mulheres que ocorrem as consequências mais graves entre elas a infertilidade (FIORAVANTE, 2003).

A infecção genital por *C. trachomatis* é a mais comum infecção bacteriana transmitida sexualmente com três milhões de novas infecções diagnosticadas por ano só nos Estados Unidos e Europa (PIPPA et al., 2010). A organização mundial de saúde estima que esse número seja de 50 milhões de novos casos por ano (OLIVEIRA et al., 2008). Em muitos países em desenvolvimento programas de rastreamento de Clamídia conseguiram reduzir a transmissão e a morbi-mortalidade por complicações no sistema reprodutivo (ECDC, 2009).

No Brasil, o Programa Nacional de DST e AIDS (PNDST/AIDS) do Ministério da Saúde estima a ocorrência de 2 milhões de casos novos a cada ano, verificando-se uma incidência de 3,5% no sexo feminino e de 2,3% no sexo masculino (MARQUES, 2007).

Esse microrganismo é responsável por mais da metade dos casos de uretrite não-gonocócica, bem como de inúmeros casos de cervicites. A infecção por clamídia difunde-se exponencialmente, particularmente entre adolescentes e jovens sexualmente ativos (RAMOS et al., 2003; MARQUES et al., 2007).

O Linfogranuloma venéreo causado pela *C. trachomatis* caracteriza-se pelo aparecimento de uma lesão genital de curta duração (de três a cinco dias), que se apresenta como uma ferida ou como uma elevação da pele. Essa lesão é passageira e não é facilmente identificada pelos pacientes. (MARQUES et al., 2007; BRASIL, 2011).

Dentre os principais testes existentes para o diagnóstico da infecção, destaca-se a pesquisa de antígenos, por meio de cultura, imunofluorescência direta (IFD) e a enzimaímmunoensaio; a pesquisa de ácidos nucléicos por métodos de amplificação (PCR, LCR); e a pesquisa de anticorpos, pela imunofluorescência indireta (IFI), microimunofluorescência indireta e enzimaímmunoensaio indireto (CARVALHO et al., 2010).

A *C. trachomatis* possui 20 sorotipos conhecidos, os sorotipos L1, L2 e L3 são responsáveis pela síndrome do linfogranuloma venéreo; os A, B, Ba e C são mais freqüentemente associados ao tracoma, e os de D a K estão ligados a outras manifestações sexualmente transmitidas, sendo que os sorotipos D, E e F são os mais freqüentes (RAMOS et al., 2003; SCHAEFFER; HENRICH, 2008).

Na maioria dos países em desenvolvimento não existem dados de incidência ou prevalência por *Chlamydia trachomatis* de caráter nacional. Por isto, habitualmente, os programas nacionais trabalham com estimativas obtidas de outros países e regiões do mundo, providas fundamentalmente, pela organização mundial de saúde (BENZAKEN et al., 2008).

No Brasil, a prevalência de infecções por *C. trachomatis* é estudada, mas não há uma padronização para sua realização (BOTELHO, 2008). Não há informações sobre os índices de Clamídia por estados ou mesmo por regiões, o que dificulta trabalhos mais direcionados.

O presente trabalho tem como objetivo verificar a prevalência atual de infecções de *C. trachomatis* em Maceió e, relacionar com os achados clínicos, citológicos e colposcópicos, para que seja evidenciada a importância de seu rastreio, estimulando esta conduta em prol da saúde da mulher.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Processos infecciosos causados por *C. trachomatis* são relatados desde a Antiguidade, principalmente na China Antiga e no Egito (SCHACHTER, 1990).

A *C. trachomatis* foi inicialmente visualizada em 1907 por Halberstaedter e Prowasek, onde foram observadas as inclusões citoplasmáticas e nos anos 1906-1911 descreveram o mesmo padrão citológicos em infecções provenientes da conjuntiva e em secreções do trato genital de mães que geraram crianças infectadas (DUARTE, 2004 ; VAZ; CECCON; DINIZ, 1999).

A doença foi introduzida no Brasil, a partir do Século XVII, no Nordeste, onde se estabeleceram os primeiros focos de trachoma no país, sendo o mais famoso o foco do Cariri, no sul do Ceará. Os focos de São Paulo e Rio Grande do Sul, que surgiram com o aumento da imigração européia para esses estados, a partir da segunda metade do Século XIX, também contribuíram para dissiminação da doença no país (BOTELHO, 2008).

2.1 Biologia Celular

A clamídia é uma bactéria gram-negativa, com ausência da camada de peptidoglicano na sua parede celular. São imóveis em virtude do pequeno tamanho e parasitismo intracelular obrigatório, as clamídias foram consideradas vírus, desde sua descrição original até os anos 60. Entretanto, diferem dos vírus, pois possuem um DNA e um RNA, presença de ribossomo que evidencia uma atividade própria da síntese de proteínas e sensibilidade a certos antibióticos (MIRANDA; GADELHA; PASSOS, 2003). São patógenos bacterianos capazes de infectar animais de sangue quente e frio, e vários tipos de células, desde os protistas do solo até as células da microglia cerebral (MAHONY; COOMBES; CHERNE, 2003). Pelo fato de apresentarem vias metabólicas para síntese de ATP, são considerados parasitas energéticos, pois utilizam ATP produzidos pelas células do hospedeiro (BLACK, 1997).

Todas as clamídias foram classificadas com base em suas propriedades fenotípicas, na ordem *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, dentro de um único

gênero *Chlamydia* e com quatro espécies: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* e *C. pecorum* (FRANCISCO, 2001; PUDJIAKMOKO et al., 1997).

Portanto, uma nova classificação taxonômica baseada na análise da sequência dos genes que codificam os rRNA 16S e 23S, propôs uma divisão a ordem em quatro famílias: 1- Chlamydiaceae, contendo dois gêneros, *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. muridarum* e *C. suis*) e *Chlamydophila* (incluindo *C. Pneumoniae*, *C. Perocum*, *C. Abortus*, *C. Caviae* e *C. felis*); 2- Simkaniaceae, para incluir *Simkania negevensis*; 3 - Parachlamydicaceae, para incluir *Parachlamydia acanthamoeba* e 4 - Waddliaceae para incluir *Waddlia chondrophila* (EVERETT; HORNING; ANDERSEN, 1999). Ambas as classificações estão atualmente em uso na literatura (CORSARO; VALASSINA; VENDITTI, 2003; STAMM et al., 2005).

De acordo com a nova classificação as espécies *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. abortus* e *C. felis* são patogênicas para humanos, enquanto que as espécies *P. acanthamoeba* e *S. negevensis* são consideradas patógenos humanos emergentes, associadas às infecções respiratórias (CORSARO; VALASSINA; VENDITTI, 2003).

A *C. pneumoniae* é um patógeno comum em todo mundo, sendo considerada a principal causa de pneumonia comunitária. O DNA desta bactéria foi detectado em líquido de pacientes com esclerose múltipla e em tecidos cerebral de paciente com a doença de Alzheimer (MAHONY; COOMBES; CHERNESKY, 2003; STAMM et al., 2005).

A espécie *C. psittaci* infecta muitas espécies entre pássaros e primatas, causando psitacose ou ornitose. Em humanos a infecção é secundária desenvolvendo pneumonia ou infecção sistêmica (MAHONY; COOMBES; CHERNESKY, 2003; VERONESI; FOCCACIA, 2002).

A *C. trachomatis* causa infecções oculares, respiratórias, linfogranuloma venéreo (LGV) e doenças do trato genital (BLACK, 1997; WARFORD et al., 1999).

As clamídias apresentam tanto antígenos comuns entre as espécies como antígenos espécies- específicos. O antígeno majoritário comum a todas as clamídias é quimicamente um lipopolissacarídeo (LPS) que apresenta um resíduo de ácido

cetodeoxioctanóico reativo. *C. trachomatis* e *C. psittaci* possuem antígenos tipo-específico, o que permite definir biotipos e sorotipos para estas espécies. A proteína de membrana (MOMP, *major outer membrane protein*), codificada pelo gene OmpA de *Chlamydia trachomatis*, apresenta heterogeneidade antigênica, permitindo sorotipagem do microrganismo pela técnica de microimunofluorescência (MAHONY; COOMBES; CHERNESKY, 2003).

A proteína de membrana rica em cisteína de 60-KDa, é também um antígeno dominante espécie-específico. Proteínas da membrana como a proteína OmcB, a proteína de choque térmico de 60-KDa(HSP60), e a MOMP já foram caracterizadas por apresentarem também epitopos gênero reativos (SEADI; et al., 2002; STAMM, et al., 2005; MAHONY; COOMBES; CHERNESKY, 2003).

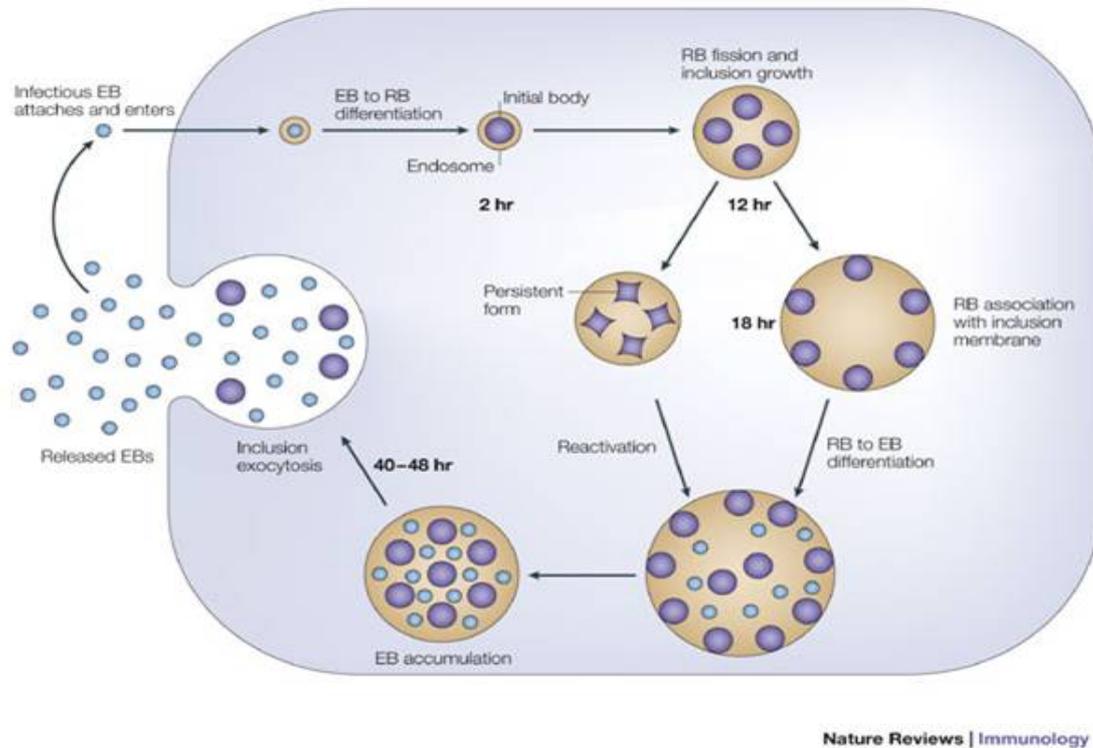
2.2 Ciclo de Desenvolvimento da *C. Trachomatis*

A clamídia possui um ciclo vital bifásico e replicação no interior do vacúolo na célula hospedeira, formando inclusões citoplasmáticas características (PASSOS; VARELLA; MIRANDA, 2005; MURRAY et al., 2004; BRUNHAM; REY-LADINO, 2005). Portanto, garantindo com isso um meio ambiente livre da competição com outros microrganismos, preservado do sistema imune e com o rico aporte de nutrientes pré-elaborados (SILVA FILHO; LONGATTO, 2002).

Na replicação apresenta um ciclo multimórfico com duas formas diferentes: os corpos elementares (CE) partícula infectante, extracelular, metabolicamente inativa e os corpos reticulares (CR) não infectante, intracelular, metabolicamente ativa e replicativa. Não ocorrendo sincronismo de desenvolvimento (SCHACHTER; STAMM, 1999; PASSOS; VARELLA; MIRANDA, 2005).

Na primeira etapa de ciclo reprodutivo, o corpo elementar (CE), adere à célula do hospedeiro suscetível, que parece envolver uma interação específica entre receptores de membrana através das microvilosidades (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de desenvolvimento da *C. trachomatis*.



Fonte: BRUNHAN; REY-LANDINO, 2005.

O complexo receptor de CE é internalizado num vacúolo por uma membrana, inibindo a fusão fagolisossômica. Então, o corpo elementar se diferencia em CR, forma metabolicamente ativa, iniciando a síntese protéica. Essas partículas utilizam os substratos do hospedeiro para dividir-se por fissão binária. Aproximadamente, 18 a 24 horas após a infecção, os corpos reticulares (RBs) gerados reorganizam-se em EBs, num processo de condensação pouco compreendido. Finalmente, a célula hospedeira morre e a inclusão se rompe, liberando numerosos CEs infectando células vizinhas (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005; PASSOS; VARELLA; MIRANDA, 2005; SCHACHTER; STAMM, 1999).

Sob condições ambientais adversas, como exaustão de nutrientes, concentração sub-ótima de antibióticos e presença de interferon gama (IFN- γ), as clamídias podem assumir a forma de corpo persistente (CP), não replicativa e que contribui para sobrevivência desta no meio intracelular, servindo de reservatório para novas infecções (MAHONY; COOMBES; CHERNESKY, 2003; HOGAN, 2004).

Segundo Silva e Longatto (2002), as infecções por *C. trachomatis* ocorrem nas células escamosas superficiais e mucosas, sendo as colunares endocervicais ou metaplásicas escamosas e parabasais do trato genital inferior as mais suscetíveis. Murray et al. (2004), descreveram que os receptores para o corpo elementar são restritos principalmente às células encontradas nas membranas mucosa da uretra, endocérnix, endométrio, trompas uterinas, ovários, reto e conjuntivas.

2.3 Genômica, Composição Química e Antigênica da *C. Trachomatis*

O genoma da *C. trachomatis* é formado por um cromossomo circular, com 1.042.519 pb (58,7% de A-T) e um plasmídio com 7493pb (GenBank AE001273). Contém RNA ribossomal (rRNA) de 23S, 16S e 5S.

O genoma clamidial codifica aproximadamente 875 proteínas, das quais setenta são exclusivas da espécie *C. trachomatis* (STEPHENS et al., 1998; <http://www.chlamydia.berkeley.edu:4231/index.html>).

Até o momento foram sequenciados alguns genomas dos sorotipos de *C. trachomatis*. Inicialmente, o genoma clamidial do sorotipo D, em seguida o sorotipo L2 e B (STAMM, et al., 2005).

O plasmídio críptico de *C. trachomatis* sorotipo D apresenta 8 ORFs (padrão de leitura aberta) intercaladas por quatro sequências curtas não codificantes de 22pb em *tandem*. Os genomas das espécies de clamídias apresentam baixa homologia entre si e seus plasmídios podem ser distinguidos por *Southern Blotting* e por mapeamento com enzimas de restrição. Todos os plasmídios de isolados de *C. trachomatis* são extremamente conservados, com menos de 1% de variação na seqüência de nucleotídica (THOMAS et al., 1997).

Foram caracterizados em isolados clínicos, *C. trachomatis* que não apresentaram plasmídio que diferenciam das demais pela morfologia não usual das inclusões e pela ausência de glicogênio (MIYASHITA et al., 2001).

A grande importância do plasmídio no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* baseado no DNA, é fornecer múltiplos alvos, pois se apresentam de 7 a 10 cópias e também podem ser usados para o desenvolvimento de novos métodos

baseados na tecnologia de microarranjos de DNA (http://www.Chlamidiae.com/docs/biology/genome_-plasmid.asp).

2.4 Processo Infeccioso Comumente Associado com Sorotipos de *C. Trachomatis*

No Brasil um dos agentes etiológicos mais comuns em DSTs é a *C. trachomatis* e sabidamente é a causadora de inúmeros problemas sendo os mais comuns genitais, como pode ser visto na Tabela 1. A espécie de *C. trachomatis* possui 18 diferentes sorotipos baseado na reatividade imunológica da proteína de membrana (MOMP). Os sorotipos L1, L2 e L3 estão associados ao linfogranuloma venéreo, os sorotipos A, B, Ba e C são mais frequentes associados ao tracoma. Os sorotipos D à K são os responsáveis pela uretrite não gonocócica e epididimite em homens e podem induzir a Síndrome de Reiter, proctite e conjutivite tanto em mulheres quanto em homens. Em mulheres são responsáveis por infecções como: cervicite, endometrite, salpingite e peri-hepatite. A *C. trachomatis* está associadas a infecções neonatais (PASSOS; VARELLA; MIRANDA, 2005; STOTHARD; TOTH; BATTEIGER, 2003; MAHONY; COOMBES; CHERNESKY, 2003; FRANCISCO, 2001).

Tabela 1 - Doenças humanas causadas por *Chlamydia trachomatis*.

Sorotipo	Sexo	Doenças
A, B, Ba, C	Ambos	Tracoma, conjuntivite, queratite
	Feminino	Uretrite, cervicite, endometrite, salpingite e Peri-hepatite
D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K	Masculino	Uretrite, Prostatite, epididimite
	Ambos	Conjuntivite, proctite. Síndrome de Reiter
	Neonatos	<i>Oftalmia neonatorum</i> , pneumonia
L1, L2, L2a, L3	Ambos	Linfogranuloma venéreo

Fonte: FRANCISCO, 2001; STOTHARD; TOTH; BATTEIGER, 2003

No local da infecção, ocorre um processo inflamatório que se caracteriza pela vermelhidão e edema, resultando no aparecimento de cervicite com descarga purulenta em mulheres e uretrites em homens. Entretanto, podem ser encontradas formas subclínicas em pessoas infectadas, em 70%- 90% das mulheres e 30%-50% dos homens (BRUNHAM; REY-LADINO, 2005; PEIPERT, 2003). Com relação à infecção por *C. trachomatis*, o maior impacto se dá no aparelho reprodutor feminino (BLACK, 1997).

Corrimento, disúria, sangramento e dor após as relações sexuais são sintomas observados em mulheres com infecção por *C. trachomatis* (FRANCISCO, 2001; WARFORD et al., 1999; BLACK, 1997).

2.5 Manifestações Clínicas das Principais Doenças Causadas pela *C. Trachomatis*

Segundo Diagnóstico da America (2010), a clamidíase pode causar manifestações clínicas bem diferente, onde podemos destacar: Uretrite/síndrome uretral aguda; cervicite; Infecções do trato genital superior; Endometrite; Salpingite; Linfogranuloma venéreo; câncer cervical.

A uretrite de modo geral é leve com secreções pouco abundante e menos purulenta do que as produzidas pela gonorréia e somente uma disúria discreta. Portanto, as uretrites podem evoluir para prostatite, epididimite, balanites, conjuntivites (auto-inoculação) e a síndrome uretro-conjuntivo-sinovial (MIRANDA, 2003).

Cervicite mucopurulenta estão relacionadas com a infecção por *C. trachomatis*, em várias situações, evoluem para seqüelas importantes tais como doença inflamatória pélvica ou infecções na gestação (ECDC, 2009)

2.6 Diagnóstico Laboratorial de *C. Trachomatis*

Existem inúmeros métodos laboratoriais para detecção de *C. trachomatis*. A Tabela 2 abaixo foi adaptada de Freitas, 2007 e apresenta os exames mais solicitados na prática médica para detecção de *C. trachomatis*. Algumas técnicas possuem grande sensibilidade, porém apresentam grande dificuldade em sua execução, como é o caso da cultura. Outras técnicas são de fácil execução e possuem baixa sensibilidade, sendo utilizadas apenas como método de triagem inicial (GONÇALVES et al., 2009)

Tabela 2 – Exames solicitados no Brasil para diagnóstico laboratorial de *Chlamydia trachomatis*.

Exames Laboratoriais	Modo de detecção	Sensibilidade da técnica e observações
Coloração pela Técnica de Giemsa	Detecta as densas inclusões citoplasmáticas granulosas causadas pela Clamídia -	Baixa sensibilidade depende do nível de experiência do microscopista
Citologia de Papanicolau	Esta técnica mostra as mesmas inclusões encontradas na coloração pelo Giemsa	Baixa sensibilidade depende do nível de experiência do microscopista
Histopatológico	Visualização tecidual de alterações celulares características	Baixa sensibilidade e especificidade.
Pesquisa de anticorpos	Detecção de anticorpos gênero-específico, contra o antígeno LPS presente nos corpos elementares ou reticulares.	As principais técnicas são a Imunofluorescência indireta e a Microimunofluorescência, porém apresentam alto custo e são muito laboriosas, apesar de sua boa sensibilidade.
Cultura	Crescimento da bactéria viva em cultura com células MacCoy	Sensibilidade de 70-85% e especificidade de 100%, porém apresenta algumas restrições como o tempo de resultado (48-72 horas) e o fato de detectar apenas bactérias vivas.
Pesquisa de Antígenos	Detecção da reação do antígeno contido no Lipopolissacarídeo (LPS) e na proteína principal externa (MOMP) através de anticorpos monoclonais marcados com enzimas.	Sensibilidade de 85% e especificidade de 98% em relação a cultura quando realizada em condições ótimas. Requer um microscopista bem treinado e há a possibilidade de falsos-positivos.

Fonte: Autor, 2012 - Adaptada de FREITAS, 2007.

2.7 Diagnóstico Molecular de *C.Trachomatis*

Atualmente os testes de imunodeteção são os mais utilizados, porém a técnica de amplificação de DNA é o método eleito por sua maior sensibilidade e especificidade, além de não apresentar dificuldades para execução laboratorial quando comparadas a outras técnicas sensíveis como as técnicas de imunofluorescência (SEADI et al., 2002; MARQUES et. al., 2007).

As sondas de DNA vêm sendo utilizadas por muito tempo em substituição aos imunoensaios em laboratório de grandes rotinas. As técnicas de hibridização são

mais fáceis de serem executadas quando comparadas a outras técnicas laboratoriais porém menor sensibilidade em relação a técnica de PCR especialmente quando se usa a PCR em tempo real (OLIVEIRA et al., 2008).

Os avanços e otimizações nas técnicas de PCR e PCR em tempo real fazem delas as melhores técnicas para detecção de *C. trachomatis* em amostras clínicas, podendo chegar a 20% a mais de sensibilidade em relação à cultura de células (XIAO et al., 2005).

O desenvolvimento dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos para detecção de *C. trachomatis* trouxe uma série de facilidades na obtenção e encaminhamento de amostras clínicas para diagnóstico. Amostras obtidas de forma não invasiva como urina e o suabe vaginal são excelentes materiais para detecção do DNA de *C. trachomatis* (AQUINO, 2005).

A detecção do material genético da Clamídia é feita seguindo a estratégia de localizar o alvo em maior quantidade, neste caso, o plasmídeo. A *C. trachomatis* possui de 7 a 10 cópias de DNA plasmidial enquanto seu DNA cromossômico possui apenas uma única cópia (SEADI et al., 2002).

2.8 Epidemiologia e Distribuição da *C. Trachomatis*

De acordo com estudos feitos pela organização mundial de saúde, estima-se que ocorram anualmente 90 milhões de casos novos de infecções por Clamídia em todo mundo, no Brasil não há um cálculo oficial da prevalência da infecção (ELEUTÉRIO et al., 2007).

Os dados publicados na literatura científica sobre a prevalência dessa infecção são isolados, sendo populações específicas, em serviços determinados, mas que mostram a importância dessa infecção silenciosa em nosso meio. A baixa idade é um dos fatores de riscos mais importantes entre os relatados estudos realizados (MIRANDA, 2003).

De acordo com o Ministério da Saúde, em 2006 (último dado disponibilizado) ocorreram aproximadamente dois milhões de casos. Grande parte desse montante é representada por adolescentes. (BRASIL, 2006).

Portanto, no Brasil a prevalência é estudada, mas não há uma padronização de técnicas laboratoriais, o que dificulta a obtenção de dados concretos (BOTELHO, 2008). (CORTES et al., 2005) encontraram uma prevalência de 14,5% em adolescentes de Goiânia (GO), usando a técnica de PCR; Benzaken et al. (2002), pesquisaram a presença *C. trachomatis* em profissionais do sexo, em método de imunofluorescência, a prevalência foi de 7,1% na cidade de Manacapuru (AM); Simões-Barbosa (2002) encontraram em Brasília (DF) uma prevalência de 0,06% de *C. trachomatis* através da colpocitologia, deste modo esta baixa prevalência é explicada por uma baixa sensibilidade do método.

Segundo Francisco (2001), estudos relatam taxas de prevalência na faixa de 5% a 20 % entre mulheres que frequentam clínicas de planejamento familiar, de 20% a 40% entre mulheres e garotas adolescentes, sexualmente ativas, que frequentam clínicas de DSTs e, em 25% de todas as mulheres de clínicas ginecológicas. Aproximadamente 8% das mulheres jovens atendidas em maternidades, sem sintomas de infecção urogenital, são portadoras de *C. trachomatis*.

Em homens assintomáticos, a prevalência de *C. trachomatis* varia de 4% a 10% e, de 15% a 20% em homens atendidos em clínicas de DST (AQUINO, 2005).

O grande desafio do controle da infecção por Clamídia é que 70% a 80% das mulheres e mais de 50% dos homens infectados não apresentam nenhum sintoma. Isso resulta em um grande reservatório de indivíduos desconhecidos e infectados, Que São Capazes De Transmitir A Infecção A Seus Parceiros Sexuais (AQUINO, 2005).

2.9 Tratamento

O tratamento da infecção por *C. trachomatis* depende do local da e da idade do paciente. O tratamento também é diferente durante a gravidez. Na infecção sem complicação, o Ministério da Saúde recomenda a administração de 1g azitromicina por via oral em dose única, ou 100 mg doxiciclina por via oral, duas vezes por dia durante sete dias (MILLER, 2006).

Pacientes com DIP (Doença inflamatória pélvica), recomenda-se Ofloxacina 400 mg duas vezes ao dia por via oral por 14 dias, ou levofloxacina 500 mg via oral uma vez ao dia por 14 dias ou com metronidazol 500 mg por via oral, duas vezes ao dia por 14 dias (BRASIL, 2006).

Durante o tratamento contra a Clamídia os pacientes devem ser orientados para o uso de preservativos até terem encerrado o seu tratamento. Deve-se lembrar que o tratamento do parceiro sexual é essencial para diminuir o risco de reinfecção do paciente (BOTELHO, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar por PCR em tempo real *Chlamydia trachomatis* em uma amostra da população feminina de Maceió atendida em serviços de saúde privados e públicos.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a prevalência de *C. trachomatis*
- Determinar o número de casos positivos de *C. trachomatis* em pacientes assintomáticas e sintomáticas
- Correlacionar os resultados de PCR com as seguintes variáveis: idade, uso de anticoncepcionais, história de DST, número de parceiros, alterações colposcópicas e citológicas.
- Comparar a positividade entre amostras dos serviços ginecológicos público e privado.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Alagoas, com processo de número 024292/2009-63, com base no item VIII. 13, b, da Resolução nº. 196/96 (Apêndice A).

4.1 Amostra

4.1.1 Características Gerais da Amostra

Foi analisada amostra cervico-vaginal de 514 mulheres voluntárias que concordaram em se submeter à pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B). A amostra é constituída de 2 grupos distintos:

- Grupo de pacientes atendidas em serviço de ginecologia privado com 176 mulheres.
- Grupo de pacientes atendidas em serviço de ginecologia público com 338 mulheres.

4.1.2 Critérios de Inclusão na Amostra

- Para os grupos foram aceitas as voluntárias de qualquer faixa etária com vida sexualmente ativa que procuraram o serviço de ginecologia.

4.1.3 Formação da Amostra

As pacientes foram convidadas a participar da pesquisa logo após realizarem consulta com as médicas responsáveis pelo serviço de ginecologia no Centro de Atendimento a Mulher do PAM Salgadinho (serviço público) e no Centro de Citologia e Colposcopia Dra. Anália Lobo (serviço privado) . A metodologia, objetivos e forma de participação foram explicados de forma detalhada e, após o consentimento das convidadas, foi preenchido um questionário (Apêndice B) e, em seguida, realizada a coleta da amostra com escova específica do Kit para HPV, *Neisseria gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (Digene Corporation, Gaithersburg, Md.), obtendo-se material da endocérvix e ectocérvix. Os resultados dos exames de citologia oncológica e colposcópico foram fornecidos pelas médicas responsáveis. O material coletado foi

enviado ao Laboratório DNA forense da UFAL para análise. As amostras eram mantidas a -20°C em tampão, conforme especificações pelo fabricante.

4.2 Detecção do Material de *Chlamydia Trachomatis*

4.2.1 Extração de DNA total da amostra

As amostras foram submetidas à extração do DNA genômico utilizando o seguinte protocolo. Foram transferidos 300 µl da amostra para tubo de 2ml e centrifugado à 3000g. O sobrenadante foi descartado e adicionados 300 µl de solução de extração (10mM Tris-HCl pH 8,0, 15mM de EDTA pH 8,0, 100mM NaCl e 0,5% SDS) seguido de 3 µl de proteinase k a 20 mg/ml (Invitrogen) para realizar digestão enzimática. As amostras foram colocadas em banho-maria a 56° C por uma hora, agitando-se o material a cada vinte minutos. Foram acrescentados 300 µl de solução contendo Fenol/Clorofórmio 1:1 mistura sendo homogeneizada por três minutos. Centrifugou-se por três minutos a 14.500 g e 600 µl da fase aquosa contendo o DNA foi transferido para outro tubo de 1,5ml. Para a precipitação do DNA usou-se isopropanol em igual proporção, homogeneizado e incubado por 20 minutos a -20° C. Nova centrifugação por 10 minutos a 14.500 rpm, descartando-se o sobrenadante por inversão. Foi adicionado 600 µl de etanol 70%, centrifugado por 5 minutos a 14.500 g e descartado o sobrenadante por inversão. O precipitado foi solubilizado em 60 µl em tampão TE (10mM de TRIS-HCl pH 8.0 e 0,1 mM de EDTA). O produto final foi armazenado a -20°C até a etapa posterior.

4.2.2 Reação de Amplificação

O DNA extraído amplificado por PCR em reações contendo 1X tampão de PCR (10mmol/l Tris-HCL, pH 8,0, 50mmol/l KCL, 2mmol/l MgCl₂), 0,2mM de dNTP, 2 µM de *primers*, e 1U Taq *Platinum* DNA polimerase (Invitrogen), em volume total de 20 µl. A termociclagem foi realizada de acordo com Arráiz Rodríguez et al. 2006, em 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 2%. Foram utilizados para a amplificação os seguintes *primers*: CTP1 - 5' -TAGTAACTGCCACTTCATCA - 3' e CTP2 5' -TTCCCCTTGTAATTCGTTGC - 3' que flanqueiam uma região de 201pb da ORF 4 do plasmídeo críptico de *C. trachomatis* descritos por Griffais e

Thibon, 1989. Este segmento localiza-se a 2940pb do sítio único de restrição BamHI.

A análise final das amostras foi realizada em PCR em tempo real devido a sua maior sensibilidade. A reação de PCR em tempo real foi realizada em termociclador modelo 7500 standard (Applied Biosystems) em modo de emulação com temperatura inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, com extensão final por 10 minutos a 72°C, seguida da curva de dissociação pré-programada pelo software do aparelho (SDS 7500 Applied Biosystems). O DNA foi amplificado em reação de 25 μ l onde se utilizou 12,5 μ l de PCR Master MIX SYBR Green® (Applied Biosystems), 7,5 μ l de H₂O Milli-Q, 3 μ l de DNA, 0,5U da enzima Taq *Platinum* DNA polimerase (Invitrogen) e 2 μ l da solução de *primers* a 6 pmol.

4.2.3 Análise do produto de amplificação da PCR em tempo real

Utilizando o software SDS 7500 (Applied Biosystems) foram observadas as curvas de amplificação e de dissociação, sendo considerado como positivo os resultados que apresentassem temperatura de Melting de 75°C para os *amplicons*.

4.2.4 Análise Estatística

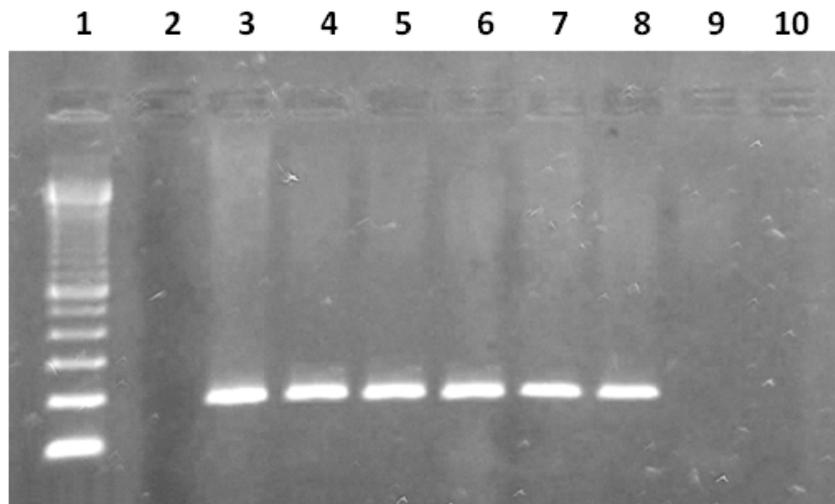
A existência de relação entre a positividade de PCR para *C. trachomatis* e as demais variáveis foi verificada por meio de regressão logística binária. A medida de associação calculada a partir do modelo logístico é o *odds ratio*. Para avaliar a significância dos coeficientes de regressão foi utilizado o teste de verossimilhança que segue a distribuição do qui-quadrado com 1 grau de liberdade. A hipótese nula (H_0), de não existência de relação entre as variáveis, foi rejeitada para valores de P menores que 0,05. Os cálculos estatísticos foram realizados através do software PASW statistics v.18.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de *C. Trachomatis* em Amostras Cérvico Vaginais em Gel de Agarose 2%.

A metodologia utilizando os primers descritos por Griffais e Thibon (1989), e os parâmetros de termociclagem com anelamento à 55°C descrito por Arráiz Rodríguez et al. 2006 apresentaram resultados satisfatórios uma vez que foi possível amplificar o fragmento de 201pb. Utilizou-se uma amostra previamente conhecida como positiva (cedida pelo laboratório ALVARO análises e pesquisas clínicas). O DNA total da amostra foi submetido à reação de PCR e visualizado em gel de agarose a 2%. Abaixo a imagem do gel confirmando que o uso e a ciclagem são ideais para detecção de *C. trachomatis*.

Figura 2 - Fotografia do gel de agarose corado com brometo de etídio. em 1) Marcador de peso molecular 100pb; 3) controle positivo; 4,5,6,7 e 8) Amostras positivas; 9) Controle negativo; 2 e 10 poços vazios.



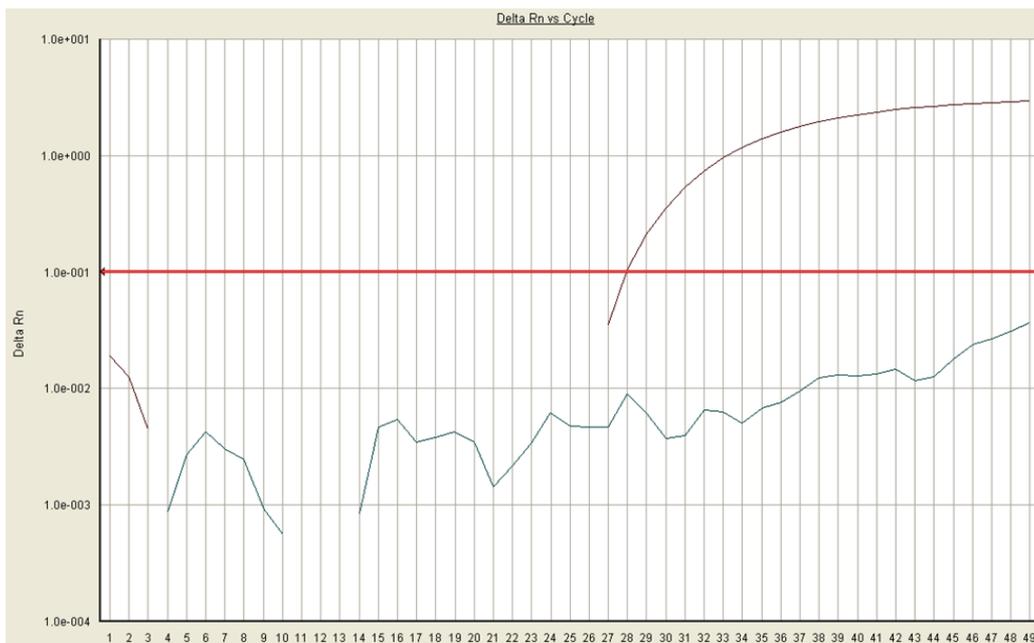
Fonte: Autor, 2011.

5.2 Detecção de *C. Trachomatis* em Amostras Cérvico-Vaginais por PCR em Tempo Real

Os ensaios em PCR em tempo real apresentaram resultados satisfatórios uma vez que as amostras sabidamente positivas apresentaram uma curva de amplificação dentro da normalidade (Figura 3) e uma temperatura de Melting compatível com os *amplicons* de *C. trachomatis*, 75°C (Figura 4).

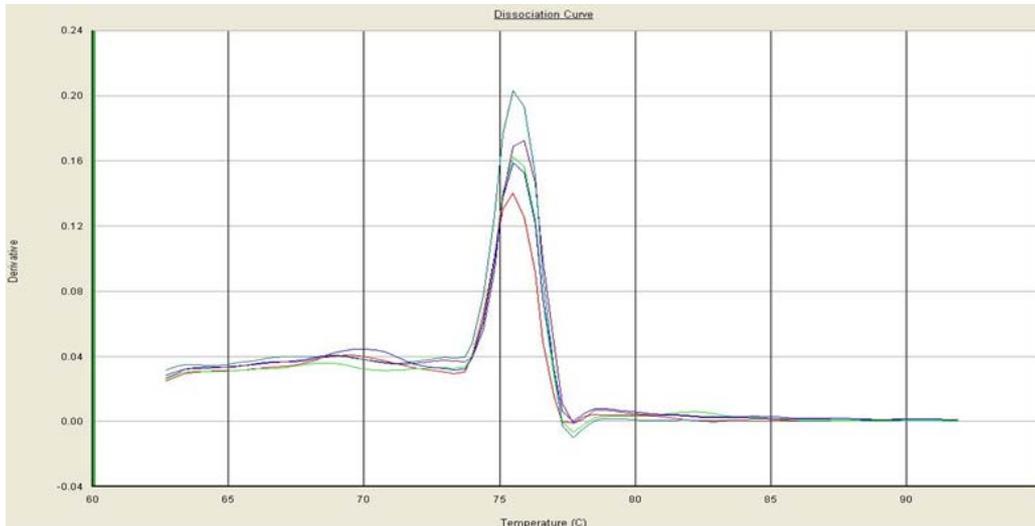
As figuras abaixo mostram telas representativas da curva de amplificação (Fig. 3) e curva de dissociação indicando positividade e a não contaminação da reação por outros produtos.

Figura 3 - Gráfico representativo da curva de amplificação



Fonte: Autor, 2011.

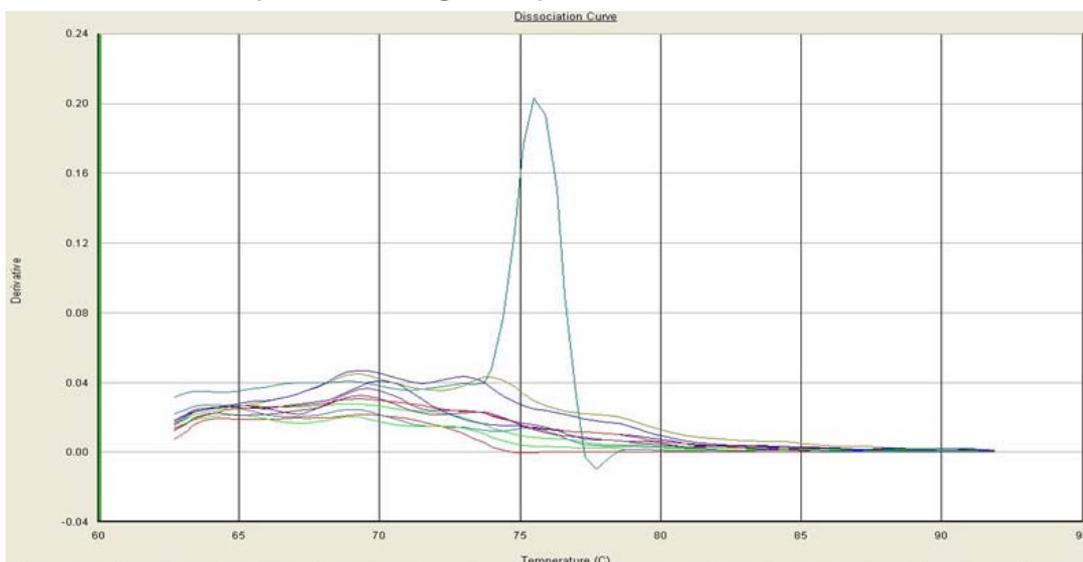
Figura 4 - Gráfico representativo das curvas de dissociação indicando positividade. A temperatura de 75°C indica que o amplicon gerado na reação de PCR em Tempo Real de acordo com sua sequência é de *C. trachomatis*



Fonte: Autor, 2011.

Amostras que não possuem DNA de *C. trachomatis* ou que porventura apresentassem alguma amplificação espúria que não correspondesse ao amplicon de 201pb apresentaria outra temperatura ou não emitiria sinal. A figura 5 mostra um gráfico representativo com uma amostra positiva e várias negativas.

Figura 5 - Gráfico representativo das curvas de dissociação indicando positividade em uma das amostras e ausência de amplicons nas demais (amostras negativas).

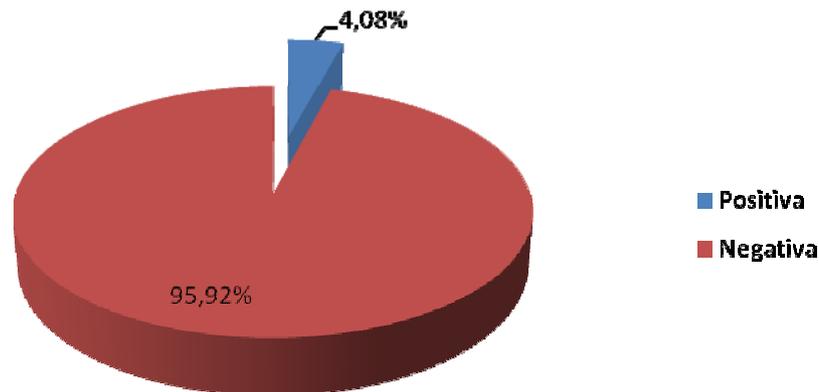


Fonte: Autor, 2011.

5.3 Prevalência de *C. Trachomatis* na amostra estudada

Foram obtidas 514 amostras coletadas no período de março a dezembro de 2010, sendo 338 da rede pública (posto de atendimento médico – PAM Salgadinho) de Maceió e 176 do centro de Citologia e Colposcopia Dr^a Anália Lobo (rede privada). Observou-se que a faixa etária variou entre 15 e 61 anos, com uma média de 32,14 anos, apresentando desvio padrão de $\pm 8,5$. Dessas amostras coletadas foram confirmados 21 casos positivos para *C. trachomatis*, o que corresponde a 4,08%.

Figura 6 - Proporções de *C. trachomatis* no período de Março a Dezembro de 2010.

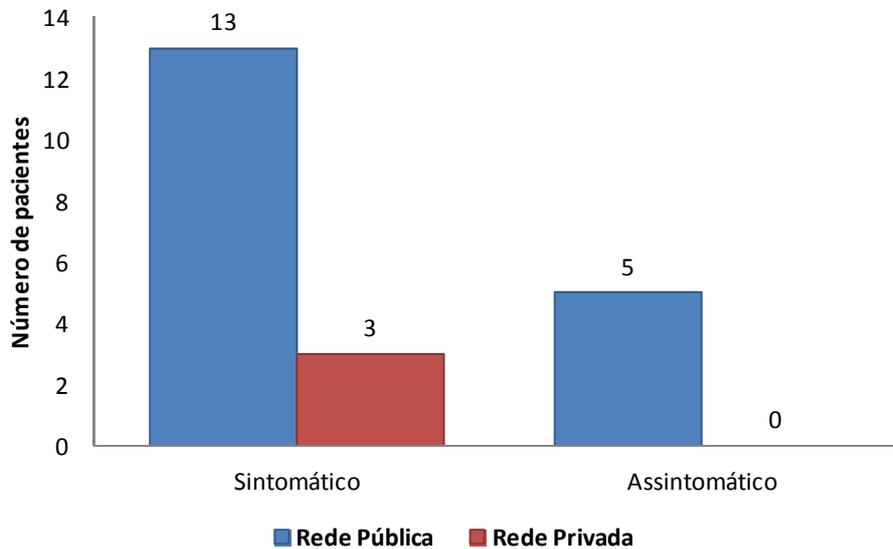


Fonte: Autor, 2011.

5.4 Número de Casos Positivos de *C. Trachomatis* em Pacientes Assintomáticas e Sintomáticas da Rede Pública e Privada

Foram observados 5 casos positivos assintomáticos (todos em pacientes atendidas na rede pública) e 16 sintomáticos (3 na rede privada e 13 na pública), correspondendo respectivamente a 23,81% e 76,19% dos casos positivos.

Gráfico 1 - Número de casos positivos de *C. trachomatis* em pacientes assintomáticos e sintomáticos, na rede pública e privada



Fonte: Autor, 2011.

5.5 Correlação entre os Resultados Positivos de PCR com Idade, Uso de Anticoncepcionais, História de DST, Número de Parceiros, Alterações Colposcópicas e Alterações Citológicas

Os resultados da análise de regressão logística são mostrados na tabela 3. Observou-se associação significativa entre a positividade para PCR e as variáveis idade e colposcopia anormal. O valor negativo do coeficiente de regressão ($\beta = -0,083$) para a variável idade indica que a positividade para a PCR foi maior entre mulheres de menor faixa etária.

Dentre os casos positivos 8 (38,1%) apresentaram idade entre 15 – 25 anos, 11 (52,38%) entre 26 – 35, 2 (9,52%) entre 36 – 45.

Tabela 3 - Correlação dos resultados positivos da PCR com as seguintes variáveis: idade, uso de anticoncepcionais, história de DST, nº de parceiros, alterações colposcópicas e citológicas.

	β	χ^2	g.l.	P	OR	95% I.C. (OR)	
						Li	Ls
Idade	-0,083	8,233	1	0,004	0,920	0,866	0,978
Anticoncepcional	0,272	0,320	1	0,572	1,312	0,519	3,322
História DST	0,419	0,879	1	0,348	1,520	0,634	3,645
Nº Parceiro	0,029	0,057	1	0,812	1,029	0,818	1,296
Alterações Colposcópicas	1,351	6,061	1	0,014	3,860	1,122	13,280
Alterações Citológicas	0,620	1,351	1	0,245	1,859	0,615	5,617

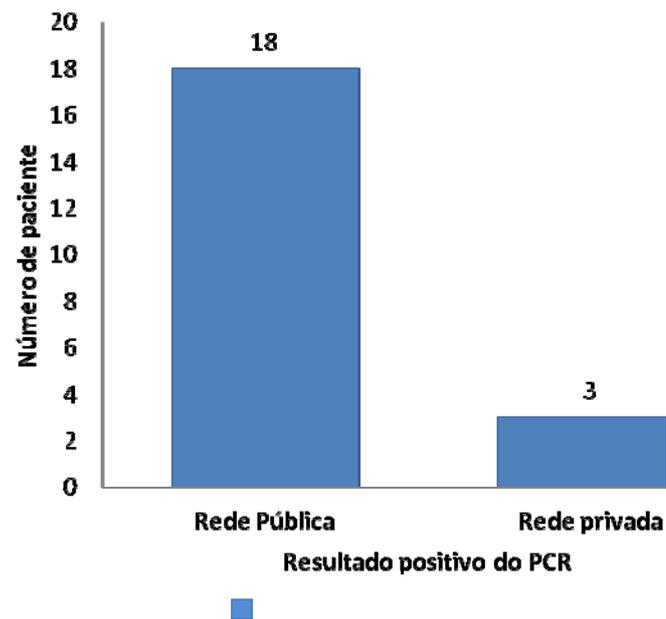
Fonte: Autor, 2011.

Durante a coleta das amostras e entrevista para preenchimento do questionário foram coletadas mais informações a respeito da clínica das pacientes, porém, nenhum destes dados apresentou correlação com a positividade para *C. trachomatis*.

5.6 Comparação da Positividade entre Amostras do Serviço Ginecológico Público e Privado

O número de casos positivos distribuídos entre as redes públicas e privadas estão demonstrados no gráfico 3. Dentre os 21 casos positivos encontrados, 18 são de mulheres atendidas no serviço público e 3 de mulheres atendidas pela rede privada. A análise de regressão logística binária indicou haver diferença significativa ($\alpha \geq 0,05$), para a positividade de PCR, entre pacientes atendidas na rede pública e privada (OR = 3,244, $\chi^2 = 4,454$, g.l.=1, $P = 0,035$).

Gráfico 2 - Número de casos positivos encontrados nos serviços ginecológicos das redes pública e privada.



Fonte: Autor, 2011.

6 DISCUSSÃO

6.1 Detecção de *C. Trachomatis* em Amostras Cérvico-Vaginais em Gel de Agarose 2%.

Alguns trabalhos utilizam o suabe para coletar amostras cérvico-vaginal, porém optamos pelo uso de kit de coleta (QIAGEN), uma vez que esse kit utiliza escova para esfoliação de células cervicais. Através deste método a quantidade de células obtidas durante a coleta é maior que a coleta que usa o suabe, conseqüentemente, as chances de detecção de *C. trachomatis* aumentam, afastando a possibilidade de falso negativo.

Na cidade de Maceió nenhum laboratório de análises clínicas utiliza a técnica de PCR para detecção de *C. trachomatis*. Todos eles utilizam a imunocromatografia baseada na reação antígeno-anticorpo, que possui uma sensibilidade inferior a técnica que detecta o DNA do patógeno.

Na literatura encontramos diversos conjuntos de *primers* para detecção de *C. trachomatis* direcionados ao seu DNA cromossômico, porém é notório que a maioria dos trabalhos utilize o DNA plasmidial como alvo principal, uma vez que podem existir dentro de uma única bactéria de 7 a 10 cópias, aumentando assim a sensibilidade do método comparado com o uso de alvos cromossômicos de cópia única (BECKER, 2005 ; POIARES et al., 2008).

Devido à diferença de protocolos de amplificação de DNA de *C. trachomatis* optamos pelo *primer* de DNA plasmidial mais utilizado (GRIFFAIS; THIBON, 1989) e, confirmamos através da amplificação de uma amostra positiva para *C. trachomatis* cedida pelo Laboratório ALVARO. O passo seguinte foi confirmar que esse protocolo seria reproduzido em nossas amostras, o que pode ser confirmado na Figura 2.

Nos testes iniciais foram observadas bandas de baixa resolução que poderiam causar dúvidas quanto ao resultado qualitativo, problema este também observado por Freitas (2007). Para solucionar este problema, os resultados finais dos testes executados neste trabalho foram realizados em PCR em tempo real por ser mais sensível que a PCR convencional. Segundo Freitas, 2007 provavelmente

as amostras com bandas fracas apresentam baixo número de cópias de DNA bacteriano.

Vários estudos relatam que a *C. trachomatis* pode ascender após certo período de infecção para o trato genital superior, persistindo e permanecendo num estado metabolicamente ativo por um período de tempo, resultando em uma PCR negativa para amostras que contenham apenas células da cérvix (DIETERLE et al., 1998; GÉRARD et al., 1998).

6.2 Detecção de *C. Trachomatis* em Amostras Cérvico-Vaginal por PCR em Tempo Real

O diagnóstico molecular de *C. trachomatis* e de outros patógenos vem sendo realizado com os recursos da PCR em tempo real há anos por apresentar maior sensibilidade em relação a PCR convencional. Para detecção de *C. trachomatis* pode-se usar diferentes tipos de amostras.

Segundo Cook et al., 2005 em sua revisão de literatura, o diagnóstico por PCR em tempo real apresenta uma significativa vantagem em relação a sensibilidade de identificação em amostras endocervicais comparado com amostras de urina.

Existem alguns cuidados que devem ser tomados quanto ao uso da PCR em tempo real para realização de exames de detecção de *C. trachomatis*. Segundo Tiemann et al., 2001 existe o risco de contaminação cruzada entre amostras de diferentes ensaios realizados em menos de 1 hora de intervalo. O equipamento utilizado possui 96 poços para reação, modelo 7500 *standard Real Time* PCR (*Applied Biosystems*) e o intervalo entre um ensaio com 96 reações e outro foi superior a 24 horas o que diminuiu a possibilidade de falsos positivos em nossos resultados.

Para confirmação de amostras positivas em PCR em tempo real, além da curva de amplificação (Figuras 3, 4 e 5) é necessário à confirmação da temperatura de Melting, pois ela permite a análise precisa dos produtos amplificados. Tiemann et al., 2001 usaram a mesma região do plasmídeo de *C. trachomatis*, porém um

conjunto diferente de *primers*, o que resultou em um fragmento de tamanho e temperatura diferente do nosso (Timemann – 214pb/ 81.5°C Melting).

6.3 Prevalência de *Chlamydia Trachomatis* na Amostra Estudada

Segundo a Organização Mundial de Saúde a infecção por *C. trachomatis* é considerada a DST de maior prevalência reconhecida mundialmente (WHO, 2005).

Não se conhece os reais comportamentos epidemiológicos da infecção por *C. trachomatis* no Brasil. Segundo Benzaken et al., 2008 as cervicites e uretrites por *C. trachomatis* não são doenças de notificação compulsória. Por isso se faz necessários estudos a nível estadual em todo o país para que se conheça a real situação da infecção por *C. trachomatis* no Brasil.

Há na literatura estudos de estudos de prevalência de *C. trachomatis* no Brasil desde a década de 80. Um problema a ser destacado é o fato destes estudos serem isolados, em populações específicas e em determinados serviços de saúde (MIRANDA; GARDELHA; PASSOS, 2003).

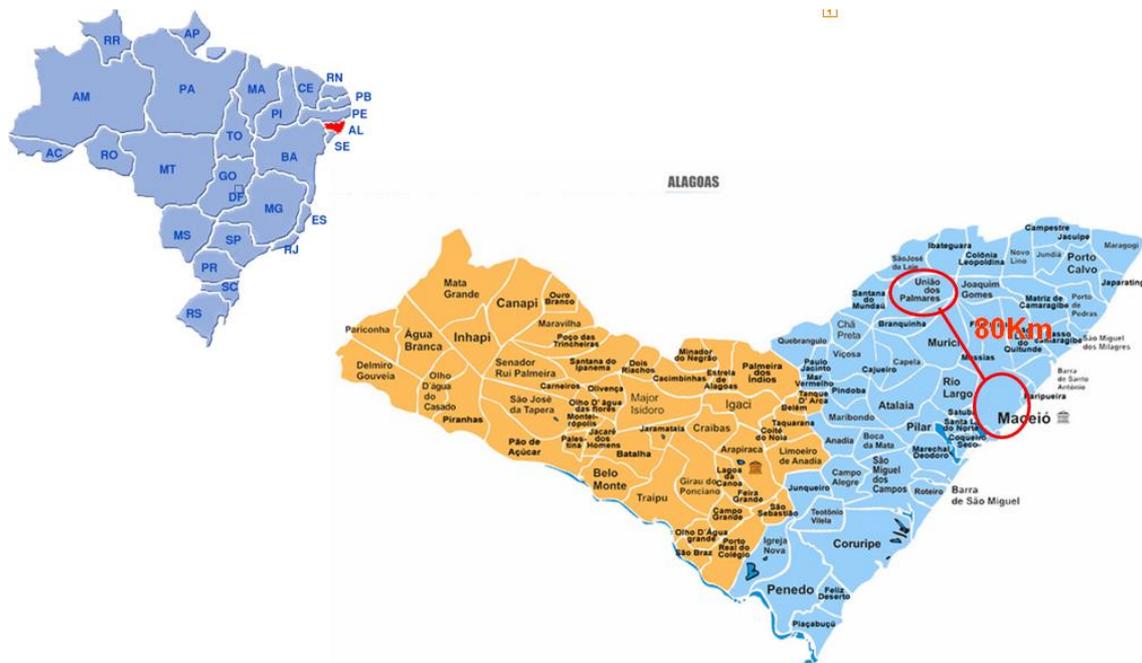
Outro problema frequente nos trabalhos de prevalência no Brasil é a falta de padronização no tipo de método escolhido para realização do estudo. Segundo o Ministério da Saúde, de acordo com o departamento de DST, AIDS e Hepatites virais (BRASIL, [201-?]) encontramos na literatura 11 abordagens diferentes para estudar prevalência de *C. trachomatis*. Dos 32 estudos apresentados pelo MS apenas 7 utilizaram a técnica de PCR (2,24% dos estudos apresentados ao MS), sendo 4 com amostras endocervicais e os outros 3 com amostras de urina.

Nossos dados mostram uma prevalência de 4,08% para cidade de Maceió, o que está de acordo com a variação encontrada por Semeniuk, et al. (2002) e Barbeyrac et al. (2004).

Em Alagoas há um trabalho de 2003 realizado por Soares et al.(2003) mostrando que no município de União dos Palmares, cidade situada a 80 km de Maceió, a prevalência de infecção por *C. trachomatis* foi de 6,4% em uma amostra estudada de 325 mulheres investigadas.

Esta diferença entre os estudos pode ser fruto da diferença sócio-econômica e demográfica da população do estudo, como pode ser observado na Figura 6.

Figura 7 - Posição geográfica do estado de Alagoas no Brasil e a distância entre Maceió e União dos Palmares.



Fonte: EDITORIA de política, 2011. Disponível em: <http://www.ojornalweb.com>.

Até o momento, os 2 trabalhos realizados em mulheres sexualmente ativas no estado de Alagoas utilizaram como técnica o princípio de detecção de ácidos nucléicos, um utilizando o método de LCR (SOARES, 2003) e o nosso utilizando o método de PCR em tempo real. Vários métodos são utilizados para diagnosticar *C. trachomatis*, mas estudos apontam que o método de PCR é mais sensível e específico, principalmente o método de PCR em tempo real (FREITAS, 2007).

De acordo com Benzaken et al.(2008) existe um problema na população estudada nos trabalhos, pois nem sempre foram representativas da população de referência. Araújo (2002) em Goiânia trabalhou com 296 amostras endocervicais coletadas em adolescentes apresentando uma prevalência de 19,6% de positividade para *C. trachomatis*. Já Santos et al.(2003) em clínicas de DST em Manaus obteve uma prevalência de 20,7% em 121 amostras estudadas.

No entanto Martin et al.(2004) em um estudo com 630 gestantes encontrou 11% de prevalência para *C. trachomatis* em Fortaleza. Por outro lado a média das prevalências de 24 trabalhos publicados de diferentes subgrupos de mulheres não grávidas foi somente de 5,4% (BENZAKEN et al. (2008).

6.4 Número de Casos Positivos de *C. Trachomatis* em Pacientes Assintomáticas e Sintomáticas e a Correlação com o Histórico Analisado de cada Paciente.

Em nosso estudo foi demonstrado que 76,19% dos casos sintomáticos estavam relacionados com o resultado positivo da PCR. Codes et al. (2002) encontrou 60, 9% de casos assintomáticos em seu estudo relacionados com infecção cervical por Clamídia, o que difere do observado no presente estudo. Porém, há uma correlação entre alterações encontradas na colposcopia e em mulheres com idade entre 25 e 35 anos, como já relatado anteriormente.

Outros autores relataram a questão da idade como um fator de relevância, pois a vida sexual está diretamente ligada a transmissão da bactéria e mulheres que possuíram mais de um parceiro sexual aumentam as chances de contraírem Clamídia (MIRANDA; GARDELHA; PASSOS, 2003; BENZAKEN et al., 2008). No entanto, em nosso estudo não foi encontrada relação significativa entre o número de parceiros sexuais das pacientes e o resultado positivo do PCR.

Dentre as outras variáveis estudadas, histórico de DSTs, uso de anticonceptivo e exame citológico anormal, não houve relação significativa com o resultado positivo do PCR.

Considerando nossos resultados e os de Johnson et al. (2002), Araújo (2002), Finan, Tamim e Almawi (2002), Codes et al .(2002, 2006), observa-se a necessidade e a importância do rastreio, uma vez que sintomas ou sinais em nada ajudam para o diagnóstico da infecção cervical por clamídia.

Ela está presente na população e a negligência aumenta o problema causado pela bactéria. A clamidíase é uma DSTs existentes no Brasil e não há campanha alguma de conscientização sobre sua prevalência da mesma forma que fazem para outras DSTs.

Pesquisas como esta devem ser continuadas e divulgadas para chamar a atenção, lembrando que o tratamento pode ser realizado de maneira simples, evitando transtornos das consequências desta infecção, muitas vezes insidiosa.

7 CONCLUSÃO

- O trabalho focou principalmente na detecção da *Chlamydia trachomatis* por PCR em tempo real em uma amostra da cidade de Maceió com o objetivo de verificar a prevalência desta DST no ano de 2010. Com base na metodologia utilizada podemos concluir que, após a devida padronização, a PCR em tempo real, demonstrou ser uma excelente forma de rastreamento, uma vez que é uma técnica laboratorial de alta sensibilidade o que oferece resultados confiáveis para informações sobre prevalência de *Chlamydia trachomatis*.

- A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria sexualmente transmissível que pode trazer uma infecção sem apresentar sintomas e por isso merece uma atenção maior do poder público. Os resultados da prevalência nos levam a concluir que há uma relação entre a situação sócio-econômica e a infecção por Clamídia, uma vez que, as mulheres atendidas na rede pública não possuem condições financeiras para serem atendidas na rede privada.

- Mulheres entre 26 e 35 anos apresentam uma prevalência maior de infecção por Clamídia.

- Os resultados positivos para Clamídia por PCR em tempo real estão relacionados com a presença de colposcopias anormais.

REFERÊNCIAS

- AQUINO, A. R. C. **Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostra de urina masculina por Reação de Cadeia da Polimerase**. 2005. 124 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- ARAÚJO, R. S. C. Estudo da infecção genital por *Chlamydia trachomatis* em adolescentes e jovens do sexo feminino no Distrito Sanitário Leste do Município de Goiânia: prevalência e fatores de risco. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 7, p. 492-492, 2002. ISSN 0100-7203
- ARRÁIZ RODRÍGUEZ, N. et al. Detección de *Chlamydia trachomatis* en muestras de hisopado endocervical por inmunofluorescencia directa y reacción en cadena de la polimerasa. **Rev. Soc. Venez. Microbiol.**, Caracas, v. 26, n.1, p. 14-18, 2006
- BENZAKEN, A. S. et al. Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* e fatores associados em diferentes populações de ambos os sexos na cidade de Manaus. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, Rio de Janeiro, v. 20, n.1, p. 18-23, 2008. ISSN 0103-4065.
- BECKER D. **Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por Reação de Cadeia da Polimerase**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- BLACK, C. M. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 10, p.160-184, 1997. ISSN 0893-8512.
- BARBEYRAC, B. et al. Evaluation of the Amplicor *Chlamydia trachomatis* test versus culture in genital samples in various prevalence populations. **Genitourin Med.**, London, v. 70, n. 3, p. 162-166, 1994. ISSN 0266-4348.
- BOTELHO, J. A. O. **Aborto em gestantes infectadas por *Chlamydia trachomatis* no estado de Mato Grosso do Sul: 2005-2007**. 2008. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Linfogranuloma venéreo**. [201-?] Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/node/117>>. Acesso em: 9 mar. 2011.
- _____. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. **Manual de vigilância epidemiológica das doenças sexualmente transmissíveis**. Brasília, 1993.
- _____. Secretaria de Projetos Especiais de Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. **Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis**. Brasília, DF, 2006.

BRUNHAN, R. C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 5, n. 2, p. 149-161, 2005. ISSN 1474-1733.

CARVALHO, N. S. et al. Prevalência da Infecção por *Chlamydia trachomatis* em Parturientes Jovens Atendidas em uma Maternidade Pública. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, Rio de Janeiro, v. 22, n.3, p. 141-144, 2010. ISSN 0103-4065.

CODES, J. S. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 325-334, fev. 2006. ISSN 0102-311X.

_____. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p. 101-106, 2002.

COOK, R. L. et al. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and neisseria gonorrhoeae. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 7, n. 142, p. 914-924, 2005. ISSN 0003-4819.

CORSARO, D.; VALASSINA, M.; VENDITTI, D. Increasing diversity within *Chlamydiae*. **CRC Crit. Rev. Microbiol.**, Boca Raton, v. 29, n.1, p. 37-78, 2003. ISSN 0045-6454.

CORTES, R. M. L. **Prevalência e fatores associados à infecção por *Chlamydia trachomatis* em adolescentes da região noroeste do município de Goiânia, Goiás.** Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2005.

DIAGNÓSTICO da América: índices de exames apoio diagnóstico. Disponível em: <<http://www.ceaclin.com.br/exames/chlamydia.shtml>>. Acesso em: 2 dez. 2010.

DIETERLE, S. et al. Presence of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in patients with chronic salpingitis and salpingitis isthmica nodosa with tubal occlusion. **Fertil. Steril.**, New York, v. 70, n.4, p.774-776, 1998. ISSN 0015-0282.

DUARTE, G. Clamídfase genital. In: _____. **diagnóstico e conduta nas infecções ginecológicas e obstétricas.** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2004. p. 95-98.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. ***Chlamydia control in Europe.*** ECDC, 2009.

ELEUTÉRIO, R. M. N. et al. Cervicite por *Chlamydia trachomatis* em mulheres sexualmente ativas atendidas em um serviço privado de ginecologia na cidade de Fortaleza. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 287-290, 2007. ISSN 0370-369X.

EVERETT, K. D. E.; HORNUNG, L. J.; ANDERSEN, A. A. Rapid detection of the *Chlamydiae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 3, p. 575-580, 1999. ISSN 0095-1137.

FINAN, R. R.; TAMIM, H.; ALMAWI, W. Y. Identification of *Chlamydia trachomatis* DNA in human papillomavirus (HPV) positive women with normal and abnormal cytology. **Arch. Gynecol. Obstet.**, Munchen, v. 266, n. 3, p. 168-171, 2002. ISSN 0932-0067.

FIORAVANTE, F. C. R. **Estudo da prevalência e dos fatores de risco associados à Infecção por *Chlamydia trachomatis* em conscritos do exército no município de Goiânia, Goiás.** 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2003.

FRANCISCO, W. Gonococcias e clamídias. In: FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratoriais das principais doenças infecciosas e auto-imune.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 101-108.

FREITAS, N. S. L. **Detecção de *Chlamydia trachomatis* pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) em mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Dona Francisca Mendes, Manaus-Amazonas.** 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2007.

GÉRARD, H. C. et al. Viability of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tubes of patients with ectopic pregnancy. **Fertil. Steril.**, New York, v. 70, n. 4, p. 945-948, 1998. ISSN 0015-0282.

GONÇALVES, A. K. S. et al. Rastreamento universal para cervicite clamidiana: uma revisão sistemática. **FEMINA**, Rio de Janeiro, 37, n. 10, p. 536-540, out. 2009. ISSN 0100-7254.

GRIFFAIS R.; THIBON, M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. **Res Microbiol.**, Jena, v. 140, n. 2, p. 139-141, 1989. ISSN 0944-5013.

HOGAN, R. J. et al. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. **Infect. Immun.**, Washington v. 72, n. 4, p. 1843-1855, Apr. 2004. ISSN 0019-9567.

JOHNSON, R.E. et al. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and neisseria gonorrhoeae infections. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v. 51, RR-15, p. 15, 2002. ISSN 0149-2195.

MAHONY, J. B.; COOMBES, B. K.; CHERNESKY, M. A. *Chlamydia* and *Chlamydophila*. In: MURRAY, P. et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology.** 9th Ed. Washington: ASM, 2003.

MARQUES, C. A. S. et al. Infecção genital por *Chlamydia trachomatis* em casais atendidos em ambulatório de esterilidade conjugal. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 13, p. 5-10, 2007. ISSN 0103-4065.

MARTIN, A. H, et al. Use of multiple nucleic acid amplication tests to define the infected-patitent "Gold Standard" in clinical trials of new diagnostic tests for Chlamydia trachomatis infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 42, n. 10, p. 4749-4758, 2004. ISSN 0095-1137.

MILLER, W.C. et al. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v. 291. n. 18, p. 2229-2236, May 2004. ISSN 0002-9955.

MIRANDA, A. E. **Padrão de comportamento e prevalência da infecção pela *Chlamydia trachomatis* em adolescentes do sexo feminino residentes na região de Maruípe em Vitória, ES.** Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

_____; GADELHA, A. M. J.; PASSOS, M. R. L. Impacto da Infecção pela *Chlamydia trachomatis* na saúde reprodutiva. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 53-58, 2003. ISSN 0103-4065.

MIYASHITA, N. et al. The 7.5-Kb common plasmid is unrelated to the drug susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. **J. Infect. Chemother.**, Tokyo, p. 113-116, 2001. ISSN 1341-321X.

MURRAY, P. R. et al. **Microbiologia médica.** 4. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2004.

OLIVEIRA, M. L. et al. Infecção por *Chlamydia trachomatis* em pacientes com e sem lesões intra-epiteliais cervicais. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 54, n. 5, p. 506-512, 2008. ISSN 0004-5241.

PASSOS, M. R. L.; VARELLA, R. Q.; MIRANDA, A. E. ***Chlamydia trachomatis*: a epidemia silenciosa. 2005..** (Em foco, 1). Disponível em: <<http://www.dst.uff.br//arquivos-pdf/clamidia.pdf>>. Acesso em: 1 mar. 2011.

PEIPERT, J. F. Clinical prctice. Genital chlamidial infections. **N. Engl. J. Med.**, Boston v. 349, p. 2424-2430, 2003. ISSN 0028-4793.

POIARES, L. A. et al. Validação do método de detecção de *Chlamydia trachomatis* por reação em cadeia da polimerase em tempo real. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 3, p. 229-232, 2008. ISSN 0370-369X.

PIPPA, O. et al. Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. **Br. Med. J. London.**, v. 340, p. 1642, 2010. ISSN 0007-1447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2851939/> >. Acesso em: 1 mar. 2011.

PUDJIATMOKO, H. et al. Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* base don 16 S rRNA gene sequences. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Ames, 23, p. 924-928,1997. ISSN 0020-7713.

RAMOS, M. C. et al. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* por PCR em urina de mulheres residentes em vila popular atendida por serviço de saúde comunitária em porto alegre, Brasil. **DST J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 2, p. 20-25, 2003. ISSN 0103-4065.

SANTOS C. et al. Detection of *Clamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. **Braz. J. Infect. Dis.** Salvador, v. 7, n. 2, p.91-95. 2003. ISSN 1413-8670.

SEADI, C. F. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 38, p. 125-133, 2002. ISSN 1676-2444.

SEMENIUK, H. et al.. Evaluation of sequential testing strategies using non-amplified and amplified methods for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical and urine specimens from women. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 42, p. 43-51, 2002. ISSN 0732-8893.

SCHAEFFER, A. ; HENRICH, B. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* and typing of the lymphogranuloma venereum associated L-serovars by TaqMan PCR. **BMC Infect. Di.**, London, v. 8, p. 56, 2008. ISSN 1471-2334.

SCHACHTER, J. Chlamydial infections. **West. J. Med.**, San Francisco, v. 153, n. 5, p. 523-534, 1990. ISSN 0093-0415.

_____; STAMM, W. *Chlamydia*. In: _____. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM Press, 1999. p. 795-806.

_____. et al. Noninvasive tests for diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection: application of ligase chain reaction to first-catch urine specimens of women. **J. Infect. Dis.**, Chicago v. 172 , n. 5, p. 1411-1414, 1995. ISSN 0022-1899.

SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO FILHO, A. **Colo uterino & vagina**: processos inflamatórios: aspectos histológicos, citológicos e colposcópicos. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

SIMÕES-BARBOSA, A. et al. Six-year follow-up survey of sexually transmitted diseases in Brasilia, the capital of Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.** Salvador, v. 6, n. 3, p. 110-117. 2002. ISSN 1413-8670.

SOARES, V. L. et al. Sexually transmitted infections in a female population in rural North-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. **Trop. Med. Int. Health.**, Oxford, v. 8, p. 595-603, 2003. ISSN 1360-2276.

STAMM W. E. et al. Introduction to chlamydial diseases and *Chlamydia trachomatis* (trachoma, perinatal infections: iymphogranuloma venereum, and other genital infections). In: MANDELL G. L. et al. (Ed.). **Principles and practice of infectious diseases**. 6th ed. Philadelphia: Elsevier, 2005. v. 2, p. 2236-2255.

STEPHENS, R. S. et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. **Science**. Washington, v. 23, n. 282, p. 754-759, 1998. ISSN 0036-8075.

STOTHARD, D. R.; TOTH, G. A.; BATTEIGER, B. Polimorphic membrane protein H has evolved in parallel with the three disease-causing groups of *Chlamydia trachomatis*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 71, p.1200-1208.2003. ISSN 0019-9567.

THOMAS, N. S. et al. Plasmid diversity in *Chlamydia*. **Microbiology**, Reading, v. 123, p. 1847-1854, 1997. ISSN 1350-0872.

TIEMANN, C. et al. Rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by real-time PCR using SYBR-Green I. In: EUROPEAN MEETING ON MOLECULAR DIAGNOSTIC, 2., 2001. Scheveningen. **Proceedings...** Scheveningen, 2001.

VAZ, F. A. C.; CECCON, M. E. J.; DINIZ, E. M. A. *Chlamydia trachomatis* infection in neonatal period. Clinical and Laboratorial aspects. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 5303-311, 1999. ISSN 0004-5241.

VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sexually transmitted and other reproductive tract infections**. Geneva, 2005. Disponível em: <http://www.who.int/reproductive-health/publications/rtis_gep/rtis_gep.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2011.

XIAO Y. et al. NF-kappa B activation is not required for *Chlamydia trachomatis* inhibition of host epithelial cell apoptosis. **J. Immunol.**, Baltimore, V. 174 p.1701–1708, 2005.. ISSN 0022-1767.

WARFORD. A. et al. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. In: Cumitech. Washington: ASM Press, 1999. v.19A, p. 2-18.

APENDICE – Questionário aplicado às pacientes voluntárias

Questionário

Data coleta: ____/____/___ Dr.(a)_____

Registro ou prontuário:_____ Código : _____

End. _____

Nome:_____ Idade: _____

Gestante : Sim () Não () Paridade:_____

Método anticonceptivo: Sim () Não () Fumante : Sim () Não ()

História de DST: Sim () Não () Qual? _____

Nº de parceiros:_____ Idade da 1º relação:_____

História Clínica:

Assintomática ()

Sintomática ()

Corrimento persistente () Ardor vaginal () Colo friável ()

Dor pélvica () Sinusiorragia () Infertilidade ()

Outros: _____

Exame de Colposcopia: Normal () Anormal ()

Achados:

Exame de Citologia:

ANEXOS

ANEXO A – Parecer favorável do Comitê de Ética e Pesquisa




**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 26/05/2010

Senhor (a) Pesquisador (a), Luiz Antônio Ferreira da Silva
Benísio Ferreira da Silva Filho
Gustavo Reis Branco de Souza
Carlos Daniel Passos Lobo
Iede Hercília Emerenciano Ferreira da Silva
Moezio de Vasconcelos Costa Santos Filho

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 20/05/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 024292/2009-63 sob o título, **Detecção de *Chlamydia Trachomatis* por PCR em uma amostra da população feminina de Maceió atendida em serviços de saúde privados e públicos** vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV, 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido. (*) Áreas temáticas especiais



Dr. Walter Mattias Lima
Presidente do Comitê de Ética

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (T.C.L.E.)

(Em 2 vias, firmado por cada participante-voluntári(o,a) da pesquisa e pelo responsável)

“O respeito devido à dignidade humana exige que toda pesquisa se processe após consentimento livre e esclarecido dos sujeitos, indivíduos ou grupos que por si e/ou por seus representantes legais manifestem a sua anuência à participação na pesquisa.” (Resolução. nº 196/96-IV, do Conselho Nacional de Saúde)

Eu,, tendo sido convidad(o,a) a participar como voluntári(o,a) do estudo Detecção de *Chlamydia trachomatis* por PCR em uma amostra da população feminina de Maceió atendidas em serviços de saúde privados e públicos., recebi d(o,a) Sr(a). Dr. Carlos Daniel Passos Lobo, d(o,a) Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) – mestrando em ciências da saúde ou do colaborador _____, responsável por sua execução, as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- Que o estudo se destina ao: Diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*
- Que a importância deste estudo é a confirmação de infecção por *Chlamydia trachomatis* em amostras duvidosas e de difícil diagnóstico
- Que os resultados que se desejam alcançar são os seguintes: Detecção precisa da *C. trachomatis* e caracterização dos sorotipos encontrados em Maceió.
- Que esse estudo começará em 01/11/2009 e terminará em 28/02/2011
- Que o estudo será feito da seguinte maneira: Serão coletadas 500 amostras para detecção por PCR da *C. trachomatis*.
- Que eu participarei das seguintes etapas: Coleta com uma escova ginecológica.
- Que os outros meios conhecidos para se obter os mesmos resultados são as seguintes: não existe.
- Que os incômodos que poderei sentir com a minha participação são os seguintes: Os mesmos de um procedimento para coleta de secreção vaginal.
- Que os possíveis riscos à minha saúde física e mental são: Nenhum
- Que, se eu vier a sofrer algum dos danos previstos em virtude de minha participação na pesquisa, eu deverei ser indenizado das seguintes formas: Por não existir danos, não há formas de indenização.
- Que deverei contar com a seguinte assistência: Procedimento não invasivo, onde não ocorrerar nenhum incidente.
- Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são: Estar contribuindo para melhor conhecimento da epidemiologia da *C. trachomatis* além de implantar o diagnóstico molecular para bactérias no estado.
- Que a minha participação será acompanhada do seguinte modo: Será realizada a colocação do espelho vaginal para visualização do colo do útero, logo depois à coleta da amostra com escova ginecológica no canal endocervical e na ectocervice.
- Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo.
- Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo.
- Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, e que a divulgação das mencionadas informações só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Endereço d(o,a) participante-voluntári(o,a)

Domicílio: (rua, praça, conjunto):
 Bloco: /Nº: /Complemento:
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone:
 Ponto de referência:

Contato de urgência: Sr(a)Carlos Daniel Passos Lobo

Domicílio: (rua, praça, conjunto) Aristides de Andrade
 Bloco: /Nº: /Complemento: 452
 Bairro: /CEP/Cidade: /Telefone : 3336-6558
 Ponto de referência: Colégio Batista Algoano / Museu de história natural -UFAL

Endereço d(os,as) responsável(is) pela pesquisa:

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
 Endereço: aristides de andrade
 Bloco: 452 LABORATÓRIO DE DNA FORENSE
 Bairro: Telefones p/contato: 3336-6558

ATENÇÃO: Para informar ocorrências irregulares ou danosas durante a sua participação no estudo, dirija-se ao:

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS:
 Prédio da Reitoria, sala do C.O.C. , Campus A. C. Simões, Cidade Universitária
 Telefone: 214-1053 (Informações obrigatórias)**

Maceió,

<p>(Assinatura ou impressão datiloscópica d(o,a) voluntári(o,a) ou responsável legal - Rubricar as demais folhas)</p>	<p>Nome e Assinatura do(s) responsável(is) pelo estudo (Rubricar as demais páginas)</p>