



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

**Desenvolvimento de uma PCR em tempo real *Multiplex* para a detecção de patógenos causadores de úlceras genitais: *Treponema pallidum*, Herpesvírus humano (HHV) 1 e 2.**

Belo Horizonte

2018



VANESSA WOLF

**Desenvolvimento de uma PCR em tempo real *Multiplex* para a detecção de patógenos causadores de úlceras genitais: *Treponema pallidum*, Herpesvírus humano (HHV) 1 e 2.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Escola de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para avaliação da tese de mestrado profissional em Microbiologia  
**Linha de Pesquisa:** Diagnóstico de Doenças Infecciosas

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Betânia Paiva Drumond

**Co-orientadora:** Dra. Danielle Alves Gomes Zauli

Belo Horizonte

2018



**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Escola de Ciências Biológicas**  
**Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

Trabalho de Defesa da Dissertação da tese de Mestrado em âmbito Mestrado profissional em Microbiologia intitulado “**Desenvolvimento de uma PCR em tempo real *Multiplex* para a detecção de patógenos causadores de úlceras genitais: *Treponema pallidum*, Herpesvírus humano (HHV) 1 e 2.**” de autoria de Vanessa Wolf, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

---

Prof. Dra Giliane de Souza Trindade

Instituto de Ciências Biológicas -Departamento de Microbiologia - Universidade Federal de Minas Gerais

---

Prof. Dr. Pedro Augusto Alves

Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz - Minas Gerais

---

Prof. Erna Geessien Kroon

Coordenadora do Mestrado Profissional, Programa de Pós Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas ICB/UFMG

Data de aprovação: Belo Horizonte, 19 de abril de 2018

Av. Antônio Carlos, 6627 - Belo Horizonte, MG - 31270-901 - Brasil - Tel.: (31) 3409-5112 - Fax: (31) 3409-5490

## AGRADECIMENTOS

A minha Mãe pelo amor e apoio incondicional, sem seu apoio nada disso seria possível.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia e a Dra. Erna Geessien Kroon.

Ao Instituto Hermes Pardini que acreditou nesta parceria e principalmente pelo investimento financeiro que tornou este projeto possível.

A minha orientadora Dra. Betânia Paiva Drumond pelo carinho, apoio, dedicação e disponibilidade para me ajudar em todas as horas, pelo crescimento acadêmico e pessoal.

A minha co-orientadora Dra. Danielle Alves Gomes Zauli pela disponibilidade, apoio, por todos os ensinamentos e companheirismo.

A Dra. Mireille Ângela Bernardes Sousa e a Patricia Bicalho pelo apoio, compreensão e confiança nestes dois anos de jornada, e pelo exemplo profissional, acadêmico e pessoal que sempre levarei comigo.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia pelas alegrias e companheirismo diário, e pela compreensão nos dias difíceis.

Aos colegas do P&D e do Laboratório de Genética pelo acolhimento e confiança.

Aos amigos, em especial a Dayane, pelo companheirismo, amizade e cumplicidade.

Aos colegas do Laboratório de Vírus, em especial a Lívia, Izabella, Paulinha e Andreia pelo acolhimento, disponibilidade e dedicação exemplares, expresse minha gratidão.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia que contribuíram para minha formação e que serviram de inspiração para minha jornada acadêmica e profissional.

*“Investir em conhecimento rende sempre os melhores juros”*

*Benjamin Franklin*

## RESUMO

As úlceras genitais, Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) têm como agente etiológico principais o *Treponema pallidum* e Herpesvírus humano (HHV) 1 e 2. As estimativas de indivíduos infectados pelos principais microrganismos causadores de úlceras genitais são crescentes no Brasil, assim como em outros países. O diagnóstico, com material coletado da lesão, é majoritariamente feito através de exames de microscopia e da avaliação clínica. Os aspectos clínicos das úlceras apresentam baixa sensibilidade e especificidade com o agente etiológico. Para a sífilis é realizado os exames de microscopia de campo escuro ou de imunofluorescência direta. Para o HHV 1 e 2 é empregado o exame citológico onde são detectadas alterações morfológicas nas células infectadas, carecendo de especificidade e sensibilidade. Em âmbito do mestrado profissional, baseada em critérios de inovação biotecnológica e mercadológica, contribuição do tema para a sociedade e aplicabilidade, propõe-se padronizar e validar um PCR em Tempo Real *Singleplex* qualitativo empregando-se o sistema de detecção por sondas complementares para detecção de *T. pallidum* e um PCR em Tempo Real *Multiplex* qualitativo para detecção de *T. pallidum* e HHV 1 e 2. Para se avaliar o critério de inovação tecnológica e mercadológica, foi realizado um levantamento para se estimar quais exames são oferecidos para o diagnóstico destas ISTs nos principais laboratórios do Brasil. Foram selecionados iniciadores e sondas da literatura e realizados testes de análise *in silico* e *in vivo* dos iniciadores e sondas. Parâmetros como tamanho dos iniciadores (em pares de base), o conteúdo de G+C e temperatura de dissociação dos iniciadores, formação de hairpin e heterodímeros, complementariedade entre os iniciadores, tamanho do produto gerado, o “E value” e o “query cover” também foram avaliados. Foram utilizadas variações nas concentrações dos iniciadores senso e anti-senso para se alcançar condições ótimas de cada reação. A eficiência da PCR e o limite de detecção (LOD) foram avaliados. Foram realizadas reações cruzadas para se avaliar a especificidade dos iniciadores e sondas. As condições da PCR foram otimizadas, o limite de detecção do *T.pallidum* foi estabelecido e estudos de interferência e reatividade cruzada foram realizados. O *Singleplex* para *T.pallidum* mostrou-se sensível e específico. O *Multiplex* também mostrou-se sensível e específico. Das 88 amostras testadas, 2 foram positivas para HHV2. O diagnóstico molecular de doenças infecciosas além de auxiliar no diagnóstico de casos típicos, auxiliam no diagnóstico de casos atípicos e também infecções múltiplas. E quando comparadas às técnicas tradicionais de microbiologia possui o tempo de resposta mais rápido e uma maior sensibilidade. Além disso, o *Singleplex* para *T.pallidum* e o

*Multiplex* para *T.pallidum* e HHV1 e 2 contribuirão para um maior crescimento científico e econômico da empresa na área de diagnóstico de doenças infecto-contagiosas, beneficiando a saúde pública regional e nacional.

**Palavras-chave:** Úlceras genitais. PCR *Multiplex* em Tempo Real. Sondas oligonucleotídicas. Herpesvírus 1 e 2. *Treponema palidum*

## ABSTRACT

Genital ulcers, Sexually Transmitted Infections (STIs), have as their main etiological agent *Treponema pallidum* and Human Herpesvirus 1 and 2. Estimates of individuals infected with the major microorganisms that cause genital ulcers are increasing in Brazil as well as in other countries. The diagnosis, with material collected from the lesion, is mostly done through microscopy and clinical evaluation. Clinical aspects of ulcers have low sensitivity and specificity with the etiologic agent. For syphilis, dark field or direct immunofluorescence microscopy examinations are performed. For HHV 1 and 2 the cytological examination is used where morphological alterations are detected in the infected cells, lacking specificity and sensitivity. In the scope of the professional master's degree, based on criteria of biotechnological and market innovation, contribution of the theme to society and applicability, it is proposed to standardize and validate a qualitative *Singleplex* Real-Time Real-Time PCR using the complementary probes detection system for *T. pallidum* and a qualitative *Multiplex* Real-Time PCR for the detection of *T. pallidum* and HHV 1 and 2. To evaluate the technological and market innovation criteria, a survey was carried out to estimate which tests are offered for the diagnosis of these STIs in the main laboratories in Brazil. Primers and probes were selected from the literature and *in silico* and *in vivo* analyzes of the primers and probes were performed. Parameters such as size of the primers (in base pairs), G + C content and primer dissociation temperature, hairpin and hetero-dimers formation, complementarity between primers, size of the product generated, "E value" and "Query cover" were also evaluated. Variations in the concentrations of the sense and antisense primers were used to achieve optimum conditions of each reaction. PCR efficiency and limit of detection (LOD) were evaluated. Cross-reactions were performed to evaluate the specificity of the primers and probes. PCR conditions were optimized, the LOD of *T.pallidum* was established, and cross-reactivity and interference studies were performed. The *Singleplex* for *T.pallidum* was sensitive and specific. *Multiplex* also proved to be sensitive and specific. Of the 88 samples tested, 2 were positive for HHV2. Molecular diagnosis of infectious diseases, besides assisting in the diagnosis of typical cases, aid in the diagnosis of atypical cases and also multiple infections. Furthermore, when compared to traditional microbiology techniques has the fastest response time and greater sensitivity. In addition, the *Singleplex* for *T.pallidum* and the *Multiplex* for *T.pallidum* and HHV1 and 2 will contribute to a greater scientific and economic growth of the company in the area of infectious diseases diagnosis, benefiting regional and national public health.

**Keywords:** Genital ulcers. Real-time *Multiplex* PCR. Oligonucleotide probes. Herpesvirus 1 and 2. *Treponema pallidum*.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Sífilis.....	24
2.1.1 Diagnóstico da sífilis.....	28
2.2 Herpes genital.....	31
2.2.1 Diagnóstico do herpes genital.....	34
2.3 Considerações sobre a validação do ensaio de PCR em tempo real.....	37
3 JUSTIFICATIVA.....	40
4 OBJETIVOS.....	42
4.1 Objetivo geral.....	42
4.1 Objetivos específicos.....	42
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
5.1 Considerações éticas.....	43
5.2 Local de realização dos experimentos.....	43
5.3 Controles.....	43
5.4 Seleção dos iniciadores e sondas específicos.....	44
5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real.....	46
5.5.1 Padronização da PCR em Tempo Real <i>Singleplex T.pallidum</i> .....	47
5.5.2 Padronização da PCR em Tempo Real <i>Singleplex HHV</i> .....	47
5.5.3 Desenvolvimento da PCR em Tempo Real <i>Multiplex</i> .....	48
5.5.4 Amostras.....	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
6.1 Seleção dos iniciadores e das sondas.....	51
6.2 Desenvolvimento da PCR em Tempo Real <i>Singleplex T.pallidum</i> .....	53
6.3 Desenvolvimento da PCR em Tempo Real <i>Singleplex HHV</i> .....	56

<b>6.4 Desenvolvimento da PCR em Tempo Real <i>Multiplex</i>.....</b>	<b>59</b>
<b>6.5 Teste de amostras clínicas.....</b>	<b>65</b>
<b>7 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>68</b>
<b>Referências.....</b>	<b>70</b>
<b>APÊNDICE A – TCLE.....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE REGISTRO DE DADOS DA PESQUISA.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO A - PESQUISA DE MERCADO DIAGNÓSTICO DE ISTs.....</b>	<b>90</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST	–	<i>Basic Local Alignment Tool</i>
CDC	–	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	–	Comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos
CLIA	–	<i>Clinical laboratory improvement amendments</i>
CT	–	<i>Quantification cycle ou threshold cycle</i>
DDAHV	–	Departamento de IST, aids e hepatites virais
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
IST	–	Infecções Sexualmente Transmissíveis
EID	–	Anticorpo de fluorescência direta
FDA	–	Administração de alimentos e drogas dos Estados Unidos da América
FTA-ABS	–	Teste de absorção de anticorpos treponêmicos fluorescente
GUD	–	<i>Genital Ulcer Disease</i>
HHV 1	–	Herpesvírus humano 1
HHV 2	–	Herpesvírus humano 2
HIV	–	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	–	Papiloma vírus humano
INPI	–	Instituto nacional da propriedade industrial
LOD	–	Limite de detecção
MMWR	–	<i>Morbidity and mortality weekly report</i>
M-PCR	–	Reação em cadeia da polimerase multiplex
NAAT	–	Teste de amplificação de ácido nucleico
OMS	–	Organização mundial da saúde
PCDT	–	Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	–	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	–	Ácido ribonucleico
SINAN	–	Sistema de informação de agravos de notificação
SMSA/BH	–	Secretaria municipal de saúde de Belo Horizonte
TCLE	–	Termo de consentimento livre e esclarecido
TAQMAN	–	Hydrolysis probes

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Infecções Sexualmente Transmissíveis e os respectivos agentes etiológicos.....	<b>20</b>
<b>QUADRO 1:</b> Testes imunológicos para diagnóstico de sífilis.....	<b>30</b>
<b>TABELA 2:</b> Iniciadores e sondas utilizadas neste estudo.....	<b>44</b>
<b>QUADRO 2:</b> Matriz de iniciadores: concentrações de iniciadores senso e anti-senso testadas nas PCRs.....	<b>47</b>
<b>TABELA 3:</b> Reações entre iniciadores, sondas e template para padronização de PCR <i>Multiplex</i> .....	<b>49</b>
<b>TABELA 4:</b> Iniciadores e sondas utilizadas neste estudo demonstrando os parâmetros avaliados.....	<b>51</b>
<b>QUADRO 3:</b> Concentrações de diluições seriadas do DNA com 6 pontos de diluição e valores de Ciclo “ <i>threshold</i> ” (Ct) de <i>Treponema pallidum</i> .....	<b>54</b>
<b>TABELA 5:</b> Reações cruzadas entre iniciadores, sondas e template para padronização de PCR <i>Multiplex</i> demonstrando o <i>amplicon</i> gerado em cada reação.....	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Úlceras genitais e seus respectivos agentes etiológicos: i e ii- <i>Treponema pallidum</i> ; iii- Herpesvírus humano 2.....	<b>22</b>
<b>FIGURA 2:</b> Micrografia eletrônica de <i>T. pallidum</i> após 5 dias de incubação formando microcolônias em células SflEp.....	<b>25</b>
<b>FIGURA 3:</b> Estrutura do Herpesvírus humano. O envelope, o tegumento e o núcleocapsídeo são indicados.....	<b>31</b>
<b>FIGURA 4:</b> Estimativas globais e regionais do número de casos existentes (prevalentes) de infecção por HHV-1 em 2012 por idade e sexo, em milhões (porcentagem de população com infecção prevalente mostrada entre parênteses).....	<b>33</b>
<b>FIGURA 5:</b> Espectro de emissão de fluorescência dos fluoróforos FAM, VIC, ABY, e JUN usados para a PCR multiplex em tempo real.....	<b>45</b>
<b>FIGURA 6:</b> Curva padrão Ct x Log de diluição do DNA da reação de PCR para detecção <i>T. pallidum</i> com 6 pontos de diluição.....	<b>54</b>
<b>FIGURA 7:</b> Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real para a definição do LOD do <i>T. pallidum</i> com 6 pontos de diluição em duplicata.....	<b>55</b>
<b>FIGURA 8:</b> Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real do Herpesvírus humano.....	<b>61</b>
<b>FIGURA 9:</b> Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real do Herpesvírus humano 2.....	<b>62</b>
<b>FIGURA 10:</b> Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real <i>T.pallidum</i> .....	<b>63</b>
<b>FIGURA 11:</b> Curvas de amplificação das amostras positivas para HHV2 da reação de PCR em tempo real <i>Multiplex</i> , para o HHV 1, HHV 2 e <i>T.pallidum</i> .....	<b>65</b>
<b>FIGURA 12:</b> Curvas de amplificação das amostras positivas para HHV2 da reação de PCR em tempo real <i>Singleplex</i> para o HHV 2.....	<b>66</b>



## 1 Introdução

O termo Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) se refere a uma variedade de infecções e doenças causadas por patógenos que são transmitidos majoritariamente por relações sexuais, como sexo vaginal, anal ou oral. Algumas IST podem também ser transmitidas através de meios não sexuais, como sangue ou produtos derivados do sangue. Muitas ISTs, incluindo clamídia, gonorréia, principalmente hepatite B, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e sífilis, também podem ser transmitidas de mãe para filho durante a gravidez, o parto e a amamentação. A transmissão materno-infantil das ISTs pode resultar em morte fetal, morte neonatal, baixo peso ao nascer e prematuridade, sepse, pneumonia, conjuntivite neonatal e deformidades congênitas. As ISTs representam um grave problema de saúde pública mundial e estima-se que mais de 1 milhão de infecções sexualmente transmissíveis são adquiridas todos os dias em todo o mundo. Mais de 900.000 mulheres gestantes foram infectadas com sífilis, resultando em aproximadamente 350.000 resultados adversos do nascimento, incluindo natimorto em 2012 (NEWMAN *et al*, 2013). A infecção pelo HPV causa 528.000 casos de câncer do colo do útero e 266.000 mortes por câncer do colo do útero a cada ano. As ISTs como gonorréia e clamídia são as principais causas de doença inflamatória pélvica (DIP) e infertilidade em mulheres. Sendo causa também de gravidez ectópica, morbidade e mortalidade.

A disseminação das ISTs é influenciada pela distribuição e prevalência de ISTs na população, bem como pelo comportamento de um indivíduo e de seu(s) parceiro(s). Muitos fatores sociais têm sido associados ao aumento do risco de ISTs. Isso pode ser devido ao fato de fatores socioeconômicos ajudarem a moldar o comportamento sexual. O termo "comportamento sexual" envolve diversos componentes: experiência e atividade sexual, idade da primeira relação sexual, número atual e vitalício de parceiros sexuais, frequência de relações sexuais, consistência de atividade sexual, modo de recrutamento de parceiros sexuais e tipos de prática sexual (GILL *et al*, 2011). É provável que certas condições socioeconômicas modifiquem o comportamento sexual. Por exemplo, as pessoas que vivem em países industrializados são mais propensas a usar preservativos, mas também são propensas a relatar múltiplos parceiros sexuais (WELLINGS *et al*, 2006). Populações de baixa renda são mais propensas a ter relações sexuais em idades mais jovens, usam menos preservativos e apresentam outros comportamentos de risco (WELLINGS *et al*, 2006) Além disso, populações de alta renda e com

maior grau de educação demonstraram correlacionar-se positivamente com o uso de preservativos (BLOOM, MAHAL, SEVILLA, 2001).

Aconselhamento e intervenções comportamentais oferecem uma prevenção primária contra ISTs, esses incluem: educação abrangente sobre sexualidade, IST e aconselhamento pré e pós teste do HIV; sexo seguro, aconselhamento para redução de riscos, promoção do uso de preservativos; intervenções dirigidas a populações-chave, como profissionais do sexo, homens que fazem sexo com homens e usuários de drogas injetáveis; e educação e aconselhamento adaptados às necessidades dos adolescentes (WHO, 2016a). Quando usados corretamente e consistentemente, os preservativos oferecem um dos métodos mais eficazes de proteção contra ISTs. O Brasil adota medidas como campanhas com o intuito de se prevenir as ISTs e contribuir para a educação sexual, como distribuição gratuita de preservativos, tratamento e diagnósticos de ISTs gratuitos. O Ministério da Saúde distribui aos serviços de saúde do SUS (Sistema Único de Saúde) os testes rápidos para HIV, sífilis e hepatites B e C. Uma ferramenta de saúde pública importante para o gerenciamento de ISTs é o rastreamento de contato ou notificação do parceiro, isto é, identificar e fornecer informações a pessoas que tiveram recentemente contato sexual com um paciente que foi recentemente diagnosticado com tal infecção (BELL, POTTERAT, 2011).

Mais de 30 patógenos são causadores de ISTs, com sintomatologia tipicamente inespecífica e com tratamento diferenciado e direcionado a cada microrganismo. Um indivíduo pode ter uma IST sem ter sintomas evidentes da doença. Os sintomas comuns das IST incluem corrimento vaginal, corrimento uretral nos homens, ardor, úlceras genitais e dor abdominal. A maioria dos patógenos é carregada cronicamente devido à sua propensão para infecção assintomática e, em alguns casos, infecção recorrente, bem como para o constrangimento que as pessoas sentem, o que os torna relutantes em procurar ajuda médica (GOERING *et al.*, 2013). Isso significa que muitos indivíduos infectadas com ISTs que poderiam ser diagnosticadas e tratadas com relativa facilidade não são identificadas.

Os testes de diagnóstico para ISTs geralmente envolvem um exame de sangue ou exame de secreções ou fluidos corporais como urina, secreções vaginais, uretrais, endocervicais, retais e da orofaringe (GHANEM *et al.*, 2018).

A detecção de anticorpos por testes sorológicos pode ser usada para diagnosticar ISTs causadas pela disseminação de patógenos que ocasionam respostas imunes sistêmicas, como HIV e vírus da hepatite B (HBV) (MEYER, 2011). A vantagem dos testes sorológicos é que eles podem ser úteis não só para o propósito de diagnóstico, mas também para a vigilância

(WHO, 2013). Alguns testes sorológicos podem ser capazes de diferenciar infecções adquiridas recentemente daquelas mais antigas ou previamente tratadas por meio da detecção da imunoglobulina M (IgM) para infecções recentes. Entretanto, o período da janela imunológica prejudica o diagnóstico precoce do agente etiológico. Outra deficiência do diagnóstico sorológico é que os anticorpos para um patógeno causador de IST podem persistir por um longo período após um tratamento bem-sucedido (WHO, 2013).

O teste de anticorpos, no entanto, é menos importante para as ISTs confinadas ao epitélio do trato genital. Por exemplo, em infecções por Papiloma Vírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) do trato genital inferior, a produção de anticorpos é baixa e geralmente tardia, e algumas vezes nem sempre detectável no sangue periférico. Em contraste, as infecções por CT ascendentes ou invasivas ao trato genital superior, como o linfogranuloma venéreo (LGV), estão associadas a fortes respostas de anticorpos, que podem ser exploradas para fins de diagnóstico (MEYER, 2011).

Há também testes de diagnóstico realizados por meio de microscopia e coloração apropriada ou preparação a fresco do material biológico para a visualização de patógenos (WHO, 2013). A microscopia, principalmente quando realizada na presença do paciente, pode fornecer resultados imediatos podendo contribuir nas decisões de manejo deste paciente, entretanto, como outros testes, possui limitações, pois necessita de equipamentos especializados (como microscópios), eletricidade ou procedimentos especiais de coloração, além de depender do treinamento e experiência do microscopista (WHO, 2013). A cultura, a detecção de antígeno ou a detecção de ácido nucleico, por meio da amplificação ou não, são frequentemente mais sensíveis que a microscopia. No entanto, podem implicar necessidades técnicas mais complexas para um ótimo desempenho do teste, o que aumenta o intervalo entre a coleta do material e a disponibilidade dos resultados do teste (WHO, 2013).

Os testes de antígeno e testes de técnicas de amplificação de ácido nucleico (NAAT), tem como uma vantagem importante quando comparados a cultura, esses testes não dependem de patógenos viáveis e, geralmente, são mais rápidos de realizar e produzir resultados (MEYER, 2011). Os testes moleculares têm se tornado uma ferramenta valiosa em laboratórios clínicos principalmente quando se trata de microrganismos que são incultiváveis em meios de cultura microbiológica, como o *Treponema pallidum*, ou que apresentam um difícil cultivo em meios de cultura, como o *Haemophilus ducreyi*. Há ainda a cultura viral, como a do Herpesvírus humano que demanda de infraestrutura especializada e é diretamente dependente da qualidade da amostra coletada. Entretanto, métodos clássicos como sorologia e cultura ainda

são importantes e continuam a ser a base para diagnosticar certas doenças, por ex. sífilis e gonorréia, respectivamente (MEYER, 2011).

O diagnóstico rápido, eficaz e preciso é de fundamental importância para o correto tratamento dos pacientes infectados, e conseqüentemente, para reduzir a incidência dos patógenos causadores destas infecções na sociedade. Cada teste diagnóstico apresenta vantagens e desvantagens, sendo que um teste mais sensível e preciso, como o NAAT que geralmente requer uma infra-estrutura mais onerosa e complexa, além de aparelhos e técnicas mais complexas. Em contrapartida, um teste menos oneroso, como a microscopia, pode carecer de sensibilidade e especificidade (WHO, 2013).

Os testes moleculares quantitativos e qualitativos tem se expandido, podendo detectar um único microrganismo ou ainda dois ou mais patógenos em uma mesma reação, nas reações chamadas *Multiplex*, utilizando-se uma única amostra (BURD, 2010).

Os NAATs altamente sensíveis e específicos surgiram como os testes diagnósticos padrão ouro para muitas doenças infecciosas. A Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real refinou ainda mais a tecnologia de amplificação de ácido nucleico com detecção em um sistema fechado e possibilitou a multiplexação para simultaneamente detectar múltiplos patógenos. É um sistema versátil, rápido e de alto rendimento para detecção de patógenos que reduziu o risco de contaminação por PCR, eliminou manipulações pós-PCR e melhorou a relação custo-benefício do teste (CHEN, BALLARD, 2012).

A Secretaria de Vigilância em Saúde, através do Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais, segundo o Protocolo clínico e diretrizes terapêutica, PCDT, (2015) considera essenciais e contam com a possibilidade de implementação de forma mais ampla dos NAATs nas ações de triagem em populações-chave (homossexuais, homens que fazem sexo com homens – HSH, profissionais do sexo, travestis, transexuais e usuários de drogas).

À medida que a tecnologia avança, é desejável que estas técnicas detectem microrganismos que compartilham sintomatologias semelhantes, pois identificando-se o agente etiológico da doença, o tratamento será específico, aumentando a possibilidade de cura, em alguns casos, interrompendo-se a cadeia de transmissão das ISTs.

## 2 Conceitos gerais e revisão da literatura

O termo IST é mais adequado e já é utilizado pela *World Health Organization* (WHO). Os patógenos causadores de ISTs podem ser bactérias, fungos, protozoários, vírus e ectoparasitas, como a sarna causada pelo *Sarcoptes scabiei* e o piolho humano *Phthirus pubis*. As principais ISTs podem ser divididas de acordo com os sintomas clínicos da infecção (Tabela 1). A prevalência, na grande maioria dos casos clinicamente relevantes, está claramente relacionada a oito patógenos. Destas oito ISTs, quatro são atualmente curáveis: sífilis, gonorréia, clamídia e tricomoníase. As outras quatro são infecções virais: hepatite B e infecções causadas pelos *Human alphaherpesvirus* 1 e 2 (HHV), HIV e HPV. Os sintomas ou as doenças decorrentes de infecções virais incuráveis podem ser reduzidos ou modificados através do tratamento (OMS, 2016b).

As ISTs representam um problema de saúde mundial, afetando a qualidade de vida de homens, mulheres e crianças, acarretando consequências físicas, psicológicas e sociais (OMS, 2016a). Em adultos, elas podem trazer complicações, tais como, doença inflamatória pélvica, aborto espontâneo, gravidez ectópica, infertilidade e câncer cervical. Em crianças, causam uma série de complicações tais como prematuridade, sífilis congênita, pneumonia, baixo peso em neonatos e cegueira (OMS, 2001). Simard e colaboradores (2011) observaram que alguns tipos de ISTs aumentam as chances de se desenvolver vários tipos de câncer. Além disso, são gerados encargos econômicos, principalmente em países subdesenvolvidos (OMS, 2016b). Os custos associados incluem custos diretos, médicos e não médicos, para cuidados e materiais, e custos indiretos do tempo gasto, quando um indivíduo não consegue se envolver em atividades produtivas (viajando para obter cura, esperando no centro de saúde para cuidados e passando por um procedimento como a coleta de espécimes). Indivíduos com úlceras genitais, exercem ainda um impacto direto na disseminação do HIV, favorecendo sua transmissão sexual. Estudos apontam que, indivíduos com úlceras genitais, causadas por *T. pallidum* e HHV 1 e 2, têm sido correlacionadas a um maior risco iminente de infecção se forem expostos ao vírus HIV (OMS, 2016b).

**TABELA 1: Infecções do sistema reprodutor e os respectivos agentes etiológicos**

Síndrome	Agente etiológico	Infecção	Tipo de agente infeccioso
Úlceras	<i>T. pallidum</i>	Sífilis	bactéria
	<i>Human alphaherpesvirus</i> (HHV)	Herpes <sup>a</sup>	vírus
	<i>Haemophilus ducreyi</i>	Cancro mole	bactéria
	<i>Klebsiella granulomatis</i>	Donovanose	bactéria
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Linfogranuloma	bactéria
Corrimentos uretral/vaginal	<i>Candida sp</i>	Candidíase vulvovaginal <sup>b</sup>	fungo
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorréia	bactéria
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Infecção por Clamídia	bactéria
	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Tricomoníase	protozoário
	Múltiplos agentes	Vaginose bacteriana <sup>b</sup>	
DIP (Doença inflamatória pélvica)	<i>Chlamydia trachomatis</i>	Endometrite, anexite,	diversos
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	salpingite,	
	Bactérias facultativas anaeróbias (ex: <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Haemophilus influenza</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> )	miometrite, ooforite, parametrite, pelviperitonite, abscesso tubo ovariano	
	Outros microrganismos		
Verruga anogenital	Papilomavírus Humano	Condiloma acumindo <sup>a</sup>	vírus

**a** infecções incuráveis, porém tratáveis, **b** são infecções endógenas do trato reprodutivo, que causam corrimento vaginal, não sendo consideradas ISTs.

Fonte: Brasil, Ministério da Saúde, 2015, adaptado.

As úlceras genitais (GUD) representam uma síndrome clínica que manifesta-se como lesões ulcerativas erosivas (Figura 1), precedidas ou não por pústulas e/ou vesículas, acompanhadas ou não de dor, ardor, prurido, drenagem de material mucopurulento, sangramento e

linfadenopatia regional (BRASIL, 2015a). Os agentes etiológicos infecciosos frequentemente associados a estas infecções são (i) *T. pallidum* causador da sífilis, (ii) os Herpesvírus humano 1 e 2, frequentemente associados à herpes perioral e genital, respectivamente, e *Haemophilus ducreyi*. Esses microrganismos podem ser encontrados isoladamente, ou em associação em uma mesma lesão como, por exemplo, úlcera genital causada por *T. pallidum* e HHV 2 (BRASIL, 2015a).

A prevalência dos agentes etiológicos causadores de GUD sofre influência de fatores geográficos, socioeconômicos, múltiplas parcerias sexuais, uso de drogas, entre outros (BRASIL, 2015a). As estimativas de indivíduos infectados pelos principais microrganismos causadores de úlceras genitais são crescentes no Brasil, assim como em outros países. HHV1 e HHV2, por exemplo, infectam principalmente populações humanas e provocam infecção contagiosa que afeta aproximadamente 60% a 95% da população mundial adulta (CHAYAVICHITSILP *et al*, 2009). No Brasil, constatou-se que, entre 2014 e 2015, houve um aumento de 32,7% do número de indivíduos com sífilis (BRASIL, 2016). No período de 2010 a junho de 2016, foram notificados no Sinan (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) mais de 227 mil casos de sífilis adquirida (BRASIL, 2016).

Os aspectos clínicos das úlceras genitais são variados e têm baixa relação de sensibilidade e especificidade com o agente etiológico, mesmo nos casos considerados clássicos (BRASIL, 2015a). O diagnóstico médico, baseado unicamente no exame físico e no histórico do paciente é frequentemente impreciso. Isto pode ser devido à similaridade do aspecto das lesões causada por diferentes agentes etiológicos (Figura 1). O diagnóstico baseado na impressão clínica apresenta valores preditivos positivos muito baixos, sendo de 30,9% para sífilis (BRASIL, 2015a).



**Figura 1: Úlceras genitais e seus respectivos agentes etiológicos: i e ii- *T. pallidum*; iii- Herpesvírus humano 2**

Fonte i: CDC/ Susan Lindsley; ii: CDC/ Dr. Gavin Hart; Dr. N. J. Fiumara

iii: <http://www.dermnet.com/images/Herpes-Type-2-Primary/picture/8217?imgNumber=28>

O diagnóstico rápido, eficaz e preciso dos agentes etiológicos, causadores de GUD, é importante, pois embora a úlcera genital esteja frequentemente associada às infecções sexualmente transmissíveis na população sexualmente ativa, a queixa de úlcera genital não é exclusividade das ISTs e pode estar associada a infecções inespecíficas causadas por fungos, vírus ou bactérias. Outras infecções que podem apresentar sintomatologia similar às úlceras genitais são as dermatoses bolhosas, como o pênfigo, a dermatite de contato e o eritema multiforme, lesões como líquen plano erosivo, lesões traumáticas, erupção fixa por drogas, afta, e até mesmo lesões malignas, como o carcinoma espino-celular (BRASIL, 2015a). Estudos constataram que, em pelo menos 25% dos pacientes com úlcera genital não há confirmação laboratorial do agente etiológico (BRASIL, 2015a; MMWR, 2015).

A prevenção é o método mais eficaz de proteção contra a transmissão e a disseminação de ISTs. O uso de métodos de barreira, como preservativos de látex é altamente indicado, entretanto, não são tão eficazes para algumas ISTs, como herpes genital e sífilis, pois observa-se que seu uso reduz, mas não elimina, o risco de infecção (CDC, 2016, KOSS *et al*, 2009, MARTIN *et al*, 2009). O herpes genital e a sífilis são principalmente decorrentes de transmissão através de contato "pele-a-pele". A transmissão ocorre pelo contato com feridas, úlceras ou mesmo com a pele infectada, que pode ser aparentemente normal. As úlceras podem ocorrer em áreas não protegidas por preservativos, facilitando a transmissão dos agentes etiológicos.

A vacinação é um dos métodos mais efetivos para se prevenir doenças. A vacinação contra ISTs está disponível somente para alguns casos, por exemplo, como aquelas ISTs causadas pelo vírus da Hepatite B e o HPV. Não existem vacinas comercialmente disponíveis para prevenir a infecção por HHV e *T. pallidum*. O ônus mundial da sífilis e a falta de êxito em décadas de esforços de saúde pública para conter a incidência da doença, evidenciam a necessidade de uma vacina eficaz contra esta patologia (CAMERON, LUKEHART, 2014). Recentemente Lithgow e colaboradores (2017) demonstraram estudos promissores no desenvolvimento de uma vacina contra *T.pallidum* em ensaios clínicos testados em coelhos. Vários ensaios clínicos testaram vacinas contra a infecção por herpes genital, mas não há atualmente nenhuma vacina disponível que seja protetora contra a infecção genital causada pelo HHV (BELSHE *et al*, 2012).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) revolucionou o campo do diagnóstico de doenças infecciosas. O diagnóstico molecular de doenças infecciosas concentra-se principalmente na identificação e monitoramento de um organismo patogênico. Muitas técnicas diferentes são usadas para identificar os organismos, incluindo PCR e suas variantes, sequenciamento ou hibridização da sonda. As principais vantagens do uso de técnicas moleculares, quando comparadas às técnicas tradicionais de microbiologia, são o tempo de resposta mais rápido e a maior sensibilidade (SCHULLER *et al*, 2010).

Os testes moleculares para detectar agentes infecciosos são amplamente utilizados em muitos laboratórios clínicos. O campo de testes moleculares para doenças infecciosas expandiu-se e agora inclui ensaios qualitativos que detectam um único alvo, ensaios quantitativos que são usados como parte do monitoramento da resposta à terapia para algumas infecções virais e ensaios em *multiplex* que detectam dois ou mais analitos no mesmo espécime (BURD, 2010).

Os formatos de ensaio de PCR evoluíram dos ensaios convencionais simples para os formatos em tempo real. Na PCR convencional a detecção do produto de DNA amplificado é mais frequentemente visualizada após a separação dos segmentos de DNA dentro de um gel de poliacrilamida ou agarose por eletroforese. (SCHULLER *et al*, 2010). A PCR quantitativa em tempo real baseada em fluorescência com sua capacidade de detectar e medir quantidades mínimas de ácidos nucleicos em uma ampla gama de amostras de várias fontes é uma tecnologia de excelência de diagnósticos moleculares, ciências da vida, agricultura e medicina. É conceitual e de simplicidade prática, além de rápida, sensível e específica. Além de seu uso como ferramenta de pesquisa, muitas aplicações de diagnóstico foram desenvolvidas, incluín-

do quantificação microbiana, determinação da dosagem gênica, identificação de alimentos geneticamente modificados, avaliação de risco de recorrência de câncer e aplicações para uso forense (BUSTIN *et al*, 2009).

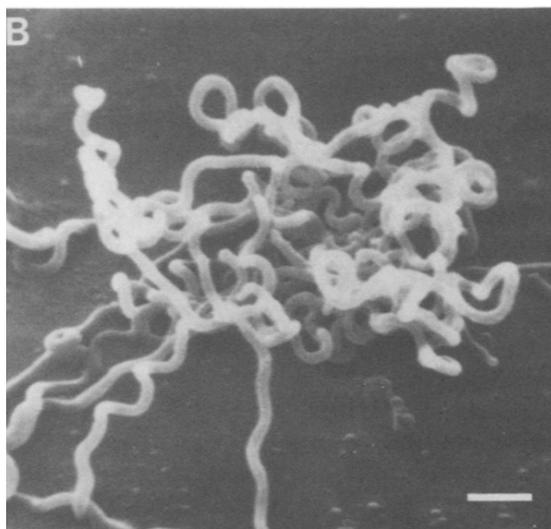
Além disso, os avanços na qualidade e desempenho dos reagentes, a compreensão da dinâmica da PCR e a evolução de produtos complementares e métodos como sondas fluorescentes e sequenciamento de DNA proporcionaram maior alcance para reações em *multiplex* de diferentes alvos de ácido nucléico em um único tubo de PCR para fornecer diagnóstico rápido de estados de doença e caracterização do subtipo de microrganismos e potencial susceptibilidade antimicrobiana.

À medida que o número de agentes microbianos detectáveis por esta técnica aumenta, torna-se altamente desejável a detecção simultânea de múltiplos agentes que causam síndromes clínicas semelhantes ou que compartilham características epidemiológicas (MARKOULATOS *et al*. 2002). O diagnóstico de agentes infecciosos é complexo quando as manifestações clínicas não são aparentes, são similares; ou, quando a infecção está na fase latente, ou mesmo em casos de infecções mistas. Como existe a possibilidade de resultados falso-negativos, principalmente nos primeiros estágios da infecção, o diagnóstico tardio pode trazer sequelas irreparáveis para os infectados, principalmente para gestantes e neonatos, além das consequências sociais, econômicas e de saúde pública envolvidas. Portanto, ressalta-se a importância na identificação precoce do patógeno ajudando no tratamento e/ou controle destas infecções. O tratamento adequado e preciso poderá aumentar a possibilidade de cura, contribuindo para uma melhor qualidade de vida destes indivíduos.

## 2.1 Sífilis

A sífilis é causada pelo *T. pallidum*, subespécie *pallidum*, bactéria espiralada, fina, com cerca de 5-20  $\mu\text{m}$  de comprimento e apenas 0,1 a 0,2  $\mu\text{m}$  de espessura (Figura 2). O *T. pallidum* possui largura e comprimento abaixo da resolução de microscopia de campo claro, e o cultivo desta espiroqueta não é possível *in vitro*, logo estudos com esse patógeno são restritos (HORVÁTH, 2011). Esta bactéria tem como característica a capacidade girar em torno do seu maior eixo e faz movimentos característicos que facilitam sua penetração nos tecidos do hospedeiro (JEPSEN *et al*, 1968; HORVÁTH, 2011). A motilidade, a capacidade de aderir às células e a quimiotaxia contribuem para a virulência deste patógeno, resultando na extrema

capacidade de invasão, rápida fixação em superfícies celulares e penetração nas junções endoteliais e nos tecidos. Esta bactéria possui baixa resistência ao meio ambiente fora do organismo hospedeiro, ressecando-se rapidamente. Por outro lado, a bactéria pode sobreviver por até 10 horas em objetos úmidos (HORVÁTH, 2011), mas apresenta grande sensibilidade à ação do sabão e de outros desinfetantes.



**Figura 2: Micrografia eletrônica de *T. pallidum* após 5 dias de incubação formando microcolônias em células SfEp. Barra 1 µm.**

Fonte: Fieldsteel *et al*, 1981.

O *T. pallidum* tem como principal via de transmissão o contato sexual com lesões infecciosas das mucosas ou pele lesada. A transmissão sexual ocorre tipicamente durante infecções primárias, secundárias ou latentes recentes. O *T. pallidum* também pode ser transmitido por transfusão sanguínea, embora seja rara e menos frequente devido à triagem rigorosa das bolsas de sangue quanto à presença de agentes infecciosos (ADEGOKE, AKANNI, 2011). Acredita-se que a transmissão sexual de *T. pallidum* ocorra apenas quando as lesões sifilíticas mucocutâneas estão presentes. Tais manifestações são incomuns após o primeiro ano de infecção (MMWR, 2015). O *T. Pallidum* pode também ser transmitido de forma vertical para o feto durante o período de gestação de uma mãe sifilítica (ADEGOKE, AKANNI, 2011).

A sífilis é uma doença multi-sistêmica, dividida em estágios, classificada como congênita ou adquirida. A sífilis congênita é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, podendo chegar a 40% a taxa de aborto, óbito fetal e morte neonatal (BRASIL, 2016a) além de implicar em parto prematuro e manifestações congênitas precoces ou tardias

(BRASIL 2017a). A transmissão vertical acontece mais frequentemente intraútero, embora se houver lesão ativa também possa ocorrer durante a passagem do feto pelo canal do parto.

A sífilis adquirida se divide em recente ou tardia. A sífilis recente consiste em sífilis primária, sífilis secundária e sífilis latente recente, enquanto a sífilis tardia consiste em sífilis latente tardia e sífilis terciária, neurosífilis, cardiosífilis e guma (AVELLEIRA, BOTTINO, 2006). A sífilis primária apresenta-se classicamente como um cancro solitário indolor no local da inoculação do *T. pallidum*, que surge de 10 a 90 dias (média de três semanas após a infecção). A lesão primária é inicialmente uma pápula rosácea com bordas induradas de fundo liso e limpo, recoberto por material seroso (BRASIL, 2017a). Sem tratamento, a infecção com *T. pallidum*, embora indolor nos estágios iniciais, pode resultar em doenças neurológicas, cardiovasculares e ósseas posteriormente e perda fetal em gestantes com infecção aguda (OMS, 2007).

A notificação compulsória de sífilis adquirida através do contágio sexual, foi instituída no Brasil em 2010. No período de 2010 a junho de 2017, foram notificados no Sinan um total de 342.531 casos de sífilis adquirida. No Brasil, constatou-se que entre 2014 e 2015 houve um aumento considerável de 32,7% do número de indivíduos infectadas pela sífilis no Brasil (BRASIL, 2016). Em 2015, o número total de casos notificados no Brasil foi de 65.878, subindo para 87.593 no ano de 2016.

A sífilis congênita é de notificação compulsória nacional desde o ano de 1986, e a notificação da sífilis em gestantes, desde 2005. A sífilis afeta um milhão de gestantes anualmente em todo o mundo. Na América Latina e Caribe, estima-se que entre 166.000 e 344 mil crianças nasçam com sífilis congênita por ano (BRASIL, 2017). No ano de 2016, foram registrados 37.436 casos de sífilis em gestantes e 20.474 casos de sífilis congênita - entre eles, 185 óbitos - no Brasil. A maior proporção dos casos foi notificada na região Sudeste (BRASIL, 2017).

Entre os anos de 2010 e 2016, a elevação da taxa de incidência de sífilis congênita e as taxas de detecção de sífilis em gestante por mil nascidos vivos aumentaram cerca de três vezes, passando de 2,4 para 6,8 e de 3,5 para 12,4 casos por mil nascidos vivos, respectivamente. A sífilis adquirida, teve sua taxa de detecção aumentada de 2,0 casos por 100 mil habitantes em 2010 para 42,5 casos por 100 mil habitantes em 2016. Entretanto, o fato de a tendência de aumento das taxas observadas para sífilis adquirida se apresentar de maneira mais acentuada representa, neste momento, em grande parte o aumento no número de notificações, ao invés de um aumento real do número de casos (BRASIL, 2017).

É importante ressaltar que, nos últimos anos, houve aumento na detecção de sífilis em gestantes, com a melhoria da vigilância epidemiológica e com a ampliação da cobertura de testagem (utilizando a tecnologia de teste rápido) no pré-natal, no âmbito da Rede Cego-nha. Equipes de Atenção Básica realizam testes rápidos para o diagnóstico de HIV e para a triagem da sífilis no âmbito da atenção ao pré-natal para as gestantes e suas parcerias sexuais. O diagnóstico da sífilis é preconizado pela portaria nº 2.012, de 19 de outubro de 2016. A sinergia entre o diagnóstico precoce e o tratamento adequado e oportuno da sífilis durante a gravidez leva à prevenção da transmissão vertical, devendo ser valorizada em todos os níveis de atenção (BRASIL, 2015a).

No Brasil, nos últimos cinco anos, foi observado um aumento constante no número de casos de sífilis em gestantes, congênita e adquirida, que pode ser atribuído, em parte, pelo aumento da cobertura de testagem, com a ampliação do uso de testes rápidos, redução do uso de preservativo, resistência dos profissionais de saúde à administração da penicilina na Atenção Básica, desabastecimento mundial de penicilina, entre outros. Além disso, o aprimoramento do sistema de vigilância pode se refletir no aumento de casos notificados (BRASIL, 2017).

O Brasil enfrenta um problema de dimensão global, que é o desabastecimento da penicilina benzatina, procaína e cristalina, medicamento que integra o Componente Básico da Assistência Farmacêutica no SUS sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento da sífilis (OAPS, 2017). Em maio de 2016, a 69ª Assembleia Mundial da Saúde reconheceu que a penicilina benzatina é um medicamento essencial, que está em escassez há alguns anos (OPAS, 2016).

Apesar da indicação em outras enfermidades, a penicilina tem destaque na terapêutica da sífilis por ser o único fármaco seguro e eficaz para a sífilis gestacional e a opção indicada para o tratamento da sífilis congênita (BRASIL, 2015b).

As empresas produtoras do medicamento no Brasil alegavam haver problemas na aquisição da matéria-prima em maio e junho de 2014, entretanto, havia a expectativa que a produção fosse regularizada a partir de julho do mesmo ano (BRASIL, 2015a), o que não ocorreu, persistindo a falta em 2016 e 2017, conforme os relatos das dificuldades na aquisição, amplamente divulgados pela mídia e discutidos pelos gestores do SUS, órgãos reguladores e conselhos de saúde (OAPS, 2017).

A causa principal apontada para o desabastecimento da penicilina tem sido a falta do insumo farmacêutico ativo (IFA) no fornecedor internacional (OAPS, 2017). O tratamento

alternativo para a sífilis, com doxiciclina ou ceftriaxona, é mais prolongado, caro e menos eficaz quando comparado ao uso da penicilina. A Organização Mundial da Saúde (OMS) também recomenda em suas diretrizes, definidas recentemente em resposta à crescente resistência bacteriana aos antibióticos, que a penicilina continua sendo a escolha racional para o tratamento da sífilis e outras ISTs (OMS, 2016).

### 2.1.1 Diagnóstico da sífilis

Os exames diagnósticos de escolha para a sífilis primária são os métodos de detecção direta, uma vez que o *T. pallidum* não pode ser cultivado em meio artificial. Os exames diagnósticos incluem a microscopia de campo escuro, imunofluorescência direta e testes moleculares, usando amostras obtidas de lesões, aspirado de linfonodo ou material de biópsia (OMS DDAHV, 2014). Exames em microscopia de campo escuro e testes para detectar *T. pallidum* diretamente de exsudato de lesões ou tecido são os métodos definitivos para o diagnóstico da sífilis primária e secundária (OMS-DDAHV, 2014). Esses métodos possuem sensibilidade de 74% a 86%, e, de acordo com a experiência do técnico que realiza o exame, a especificidade do exame pode alcançar 97% (BRASIL, PCDT, 2015). Entretanto, a microscopia de campo escuro está limitado a laboratórios especializados, pois necessita de microscopia especializada. Além da amostra ter baixo prazo de estabilidade, devendo o teste ser realizado preferencialmente 20 minutos após a coleta (CDC, 2018). Outro fator importante é a equipe responsável pelo exame, que deve ser de profissionais bem treinados e experientes, capazes de diferenciar o *T. pallidum* de treponemas não patogênicos, como o *Treponema denticula*, e outros microrganismos espiralados comumente encontrados nas membranas genital ou mucosa anal (OMS-DDAHV, 2014).

Todas as técnicas de microscopia utilizando materiais corados apresentam sensibilidade inferior à microscopia de campo escuro. Os métodos disponíveis são: método Fontana-Tribondeau, método de coloração pelo Giemsa, método de Burri e método de Levanduti (OMS-DDAHV, 2014).

Os testes sorológicos para sífilis são amplamente utilizados na prática clínica podendo ser divididos em dois tipos: os testes treponêmicos e não treponêmicos. Os testes treponêmicos utilizam lisados completos de *T.pallidum* ou antígenos treponêmicos recombinantes e detectam anticorpos específicos (geralmente IgM e IgG) contra componentes celulares

dos treponemas (BRASIL, 2016). Os testes não treponêmicos por sua vez, detectam anticorpos anti-cardiolipina que não são específicos para os antígenos G do *T.pallidum* (BRASIL, 2016).

Os testes não treponêmicos: podem ser qualitativos ou quantitativos. O teste qualitativo indica a presença ou ausência de anticorpo na amostra. O teste quantitativo permite determinar o título de anticorpos. O título é importante para o diagnóstico e monitoramento da resposta ao tratamento. Isso porque a queda do título é indicação de sucesso do tratamento. Existem quatro tipos de testes não treponêmicos com metodologia de floculação: VDRL (do inglês *Venereal Disease Research Laboratory*), RPR (do inglês *Rapid Test Reagin*), USR (do inglês *Unheated Serum Reagin*) e TRUST (do inglês *Toluidine Red Unheated Serum Test*). O VDRL baseia-se em uma suspensão antigênica composta por uma solução alcoólica contendo cardiolipina, colesterol e lecitina purificada e utiliza soro inativado como amostra. O RPR, o TRUST e o USR são modificações do VDRL que visam aumentar a estabilidade da suspensão antigênica (USR, RPR e TRUST), possibilitar a utilização de plasma (RPR e TRUST) e permitir a leitura do resultado a olho nu (RPR e TRUST) (BRASIL, 2016).

O primeiro teste imunológico a se tornar reagente na sífilis primária é a absorção fluorescente de anticorpos treponêmicos (FTA-Abs), este é seguido pelos outros testes, treponêmicos e não treponêmicos (Quadro 1) (MTDS, 2016). Os anticorpos começam a surgir na corrente sanguínea cerca de 7 a 10 dias após o aparecimento do cancro duro. Por isso, no início desse estágio, os testes imunológicos podem não apresentar reatividade, logo, os NAATs oferecem a vantagem diagnóstica.

**QUADRO 1: Testes imunológicos para diagnóstico de sífilis**

<b>Testes não treponêmicos</b>		
<b>Técnica</b>	<b>Testes</b>	
Floculação	VDRL (Venereal Disease Laboratory) RPR ((Rapid Test Reagin) USR (Unheated Serum Reagin) TRUST (Toluidine Red Unheated Serum Test)	Quantificáveis (ex.: 1:2; 1:4; 1:8)  Importantes para o diagnóstico e monitoramento da doença
Aglutinação	Testes rápidos	
Imunoenzimáticos (ELISA)	ELISA (Enzyme – linked immunossorbent assay)	
<b>Testes treponêmicos</b>		
<b>Técnica</b>	<b>Testes</b>	
Imunofluorescência indireta	FTA-Abs (Fluorescent treponemal antibody absorption)	Na maioria das vezes permanecem reagente após o tratamento, pelo resto da vida do indivíduo.  Não são indicados para o monitoramento da resposta ao tratamento
Hemaglutinação	MHA-TP (microhemaglutinação para <i>T. pallidum</i> )	
Aglutinação de partículas	TPPA (Treponema pallidum particle agglutination assay)	
Imunoenzimáticos e suas variações	ELISA (Enzyme-linked immunossorbent assay), CMIA (Ensaio imunológico quimioluminescente magnético)	
Imunocromatografia e fluxo lateral	Testes rápidos	
Testes moleculares	PCR	

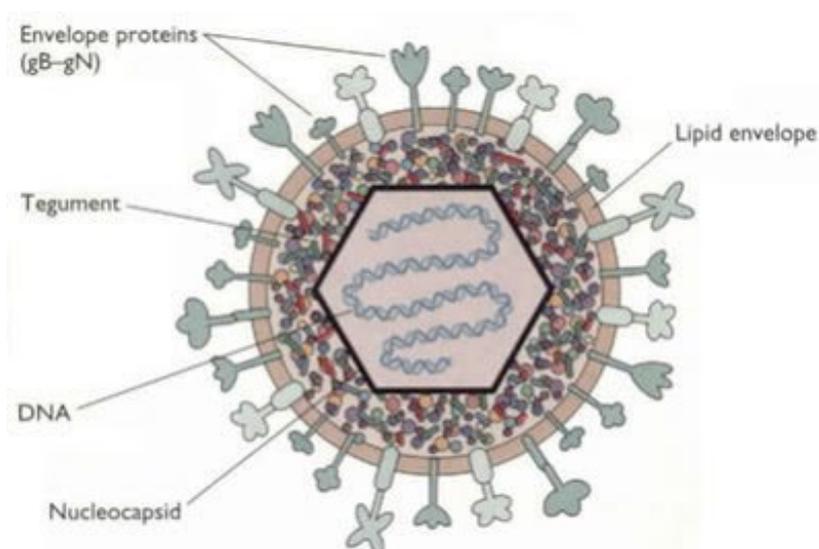
Fonte: Ministério da saúde (BRASIL, 2015a), (BRASIL, 2010), adaptado.

O diagnóstico baseado unicamente na avaliação clínica é feito rotineiramente, entretanto, tendo em vista suas limitações e as limitações dos exames diagnósticos de escolha para a sífilis primária, vários ensaios de PCR foram desenvolvidos e vêm sendo empregados com sucesso para detectar sequências-alvo de DNA específicas para *T. pallidum* em lesões primárias e secundárias (CHEN *et al*, 2006; GAYET-AGERON *et al*, 2009; LIU *et al*, 2009). A sensibilidade analítica desses ensaios é equivalente a aproximadamente 10 organismos por

reação (OMS DDAHV, 2014). Embora não haja testes de detecção de *T. pallidum* disponíveis comercialmente liberados pela FDA (*Food and Drug Administration*) alguns laboratórios fornecem testes de PCR desenvolvidos e validados *in house* para a detecção do DNA do *T.pallidum* (MMWR, 2015; OMS, 2014).

## 2.2 Herpes genital

O *Human alphaherpesvirus 1* (HHV1) e o *Human alphaherpesvirus 2* (HHV2), são vírus de DNA de fita dupla, pertencentes à Ordem *Herpesvirales*, à Família *Herpesviridae*, à Subfamília *Alfaherpesvirinae*, ao Gênero *Simplexvirus* segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Antigamente popularmente denominados herpes simples HSV 1 e HSV 2. O vírion dos HHV possui quatro partes: um cerne contendo DNA viral; um capsídeo icosaédrico; um tegumento, uma camada amorfa de proteínas que rodeiam o capsídeo e um envelope (WHITLEY, ROIZMAN, 2001) (Figura 3). O HHV1 e o HHV2 compartilham uma estrutura genômica com 40% de similaridade de seqüências e 83% de similaridade em suas regiões codificantes, o que explica, em parte, as numerosas semelhanças biológicas entre os dois vírus (OMS, 2013).



**Figura 3: Estrutura do Herpesvírus humano. O envelope, o tegumento e o nucleocapsídeo são indicados.** Fonte: <https://microbeonline.com/wp-content/uploads/2010/04/Herpes-Simplex-Virus.jpg>

Durante a infecção primária, o HHV penetra em rupturas na pele ou mucosas, se adere e penetra nas células epiteliais, dando início ao seu ciclo de multiplicação. O herpes genital primário aparece como máculas e pápulas, seguido por vesículas, pústulas e úlceras rasas, que formam crosta e curam-se espontaneamente em duas ou três semanas, sem deixar cicatrizes (WHITLEY, ROIZMAN, 2001).

O vírus pode infectar terminações nervosas sensoriais livres e ser transportado para os gânglios sensoriais localizados nessa região da pele (WHITLEY, ROIZMAN, 2001). Após a recuperação da infecção inicial, o vírus permanece latente no gânglio sensorial por toda a vida do hospedeiro (OMS, 2013). Geralmente, os pacientes infectados sofrem quadros de recidivas recorrentes devido à reativação dos vírus latentes (JOHNSTON *et al*, 2011). As recidivas, geralmente, são mais localizadas, suaves e de menor duração e, tendem a ocorrer após gatilhos como estresse, menstruação, exposição à luz solar, fadiga, dentre outros (JOHNSTON *et al*, 2011). Periodicamente, o vírus pode ser reativado do seu estado latente e trafegar por meio do nervo sensorial para a superfície da pele ou mucosa. A liberação intermitente de vírus pode ocorrer tanto na presença de lesões (reativação clínica) ou na ausência das lesões (reativação subclínica) mediante sintomas muito leves ou ausentes. A liberação de vírus na superfície da mucosa leva à transmissão para parceiros sexuais (OMS, 2013).

O HHV2 é particularmente preocupante devido à sua sinergia epidemiológica com a infecção e transmissão do HIV. Os indivíduos infectados com HHV2 são aproximadamente três vezes mais propensos a se infectarem com o HIV (FREEMAN *et al*, 2006), e as pessoas com HIV e HHV2 são mais propensas a transmitir o HIV para outros (GRAY *et al*, 2001). Além disso, a infecção pelo HHV2 em indivíduos soropositivos para HIV pode oferecer uma gravidade maior e pode levar a complicações graves, como infecções cerebrais, oculares ou pulmonares (LINGAPPA *et al*, 2010).

O HHV2 é a causa mais comum de úlceras genitais em muitos países. Estima-se que 19,2 milhões de novas infecções por HHV2 ocorreram em adultos e adolescentes (15 a 49 anos), em todo o mundo, em 2012, com as maiores taxas entre grupos mais jovens (MMWR, 2015). A prevalência mundial estimada de HHV2 se traduz em um número estimado de 530 milhões de indivíduos (BRASIL, 2015).

O HHV1 causa tipicamente o herpes oral. No entanto, o HHV1 também pode ser transmitido aos órgãos genitais através do sexo oral e é cada vez mais notado como causa do HHV genital, especialmente em países desenvolvidos. Uma proporção crescente de infecções

herpéticas anogenitais tem sido atribuída à infecção pelo HHV1, principalmente entre as mulheres jovens e homens que têm relações sexuais com homens (MMWR, 2015). Estima-se que 3709 milhões de pessoas com idade entre 0-49 anos tiveram infecção prevalente por HHV1 em 2012 (67%), com maior prevalência na África, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (Figura 4) (LOOKER *et al*, 2015). Assumindo que 50% das infecções incidentes entre os jovens de 15-49 anos são genitais, estima-se que 140 milhões (variação: 67-212 milhões) de pessoas tiveram infecção genital por HHV1, sendo a maior incidência nas Américas, Europa e Pacífico Ocidental (Figura 4) (LOOKER *et al*, 2015).

Both sexes											
Age group (years)											
	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	All ages
Global total (all)	175 (27%)	353 (57%)	392 (66%)	420 (71%)	453 (74%)	439 (75%)	394 (76%)	378 (77%)	367 (78%)	337 (79%)	3709 (67%)
Females											
Age group (years)											
Region	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	All ages
Americas	3	9	14	18	21	22	23	23	23	23	178 (49%)
Africa	36	57	52	45	40	35	29	23	18	15	350 (87%)
Eastern Mediterranean	9	20	24	25	25	24	20	16	14	12	188 (75%)
Europe	5	12	16	19	24	26	26	26	26	27	207 (69%)
South-East Asia	24	49	53	52	51	49	45	41	37	32	432 (59%)
Western Pacific	11	27	36	48	65	63	53	60	65	59	488 (74%)
Global total (females)	86	175	194	208	225	219	196	188	183	168	1843 (68%)
Males											
Age group (years)											
Region	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40-44	45-49	All ages
Americas	2	6	10	14	16	18	19	19	19	20	142 (39%)
Africa	37	58	53	46	40	35	29	23	18	15	355 (87%)
Eastern Mediterranean	9	22	25	26	27	26	22	18	15	13	202 (75%)
Europe	3	8	12	16	21	24	25	25	26	26	187 (61%)
South-East Asia	26	53	57	56	54	51	47	42	38	34	458 (58%)
Western Pacific	12	31	41	54	70	67	55	62	68	62	521 (73%)
Global total (males)	89	179	198	212	228	220	197	189	184	169	1866 (66%)

Totals may be slightly different due to rounding. Sex-specific estimates for Africa, Eastern Mediterranean, South-East Asia and Western Pacific were generated by applying modelled prevalence, fitted without stratification by sex, to sex-specific population sizes. Slight differences in prevalence averaged across all ages between the sexes for these regions are therefore due to different population sizes by sex.

doi:10.1371/journal.pone.0140765.t001

**Figura 4: Estimativas globais e regionais do número de casos existentes (prevalentes) de infecção por HHV-1 em 2012 por idade e sexo, em milhões (porcentagem de população com infecção prevalente mostrada entre parênteses).** Fonte: Looker *et al* (2015), <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0140765>

Aproximadamente 2% das mulheres tem herpes genital durante a gravidez e cerca de 20% a 30% das mulheres grávidas são soropositivas para HHV2. A prevalência de HHV2 varia entre países, sexo e idade. Ela é maior em áreas da África subsaariana e partes da América Central e América do Sul (CHAYAVICHITSILP *et al*, 2009). Estudos recentes mostraram que houve aproximadamente 14.000 casos/ano de herpes neonatal entre 2010 e 2015, no mundo. A taxa global foi estimada em cerca de 10 casos por 100.000 nascidos vivos no mundo (LOOKER *et al*, 2017). A infecção neonatal pelo vírus HHV é uma complicação potencialmente devastadora do herpes genital durante a gravidez. É raro, mas está associado a uma morbidade e mortalidade consideráveis, se não tratada, a taxa de mortalidade por caso é estimada em 60%. Mesmo com tratamento antiviral, as taxas de mortalidade e comprometimento neurológico duradouro permanecem consideráveis, especialmente para neonatos com doenças do sistema nervoso central (cerca de 30% dos casos) e doença disseminada (25% dos casos) em comparação com aqueles com doença de pele, olhos e mucosa (cerca de 45% dos casos). A infecção por herpes neonatal é uma condição dispendiosa, uma vez que o monitoramento permanece intenso, necessitando de tratamento com drogas intravenosas e testes laboratoriais extensivos. E muitas vezes resulta em custos de longo prazo associados a deficiência grave causados por sequelas neurológicas (LOOKER *et al*, 2017).

### **2.2.1 Diagnóstico do HHV1 e HHV2**

O diagnóstico clínico do herpes genital pode ser difícil, porque as múltiplas lesões dolorosas vesiculares ou ulcerativas tipicamente associadas ao HHV estão ausentes em muitas pessoas infectadas (MMWR, 2015). Episódios de recorrências e reativações subclínicas são muito mais frequentes para a infecção genital pelo HHV2 do que para a infecção genital pelo HHV1 (MMWR, 2015). O prognóstico de um paciente e o tipo de aconselhamento necessário dependem do tipo de herpes genital (HHV1 ou HHV2) causador da infecção; portanto, o diagnóstico clínico do herpes genital deve ser confirmado por testes laboratoriais específicos para cada tipo viral (MMWR, 2015).

O diagnóstico baseado unicamente na avaliação clínica é feito rotineiramente, entretanto o isolamento viral através da cultura e a PCR são os testes de escolha indicados para a detecção dos Herpesvírus humanos (MMWR, 2015). O isolamento viral é classicamente considerado o padrão-ouro e apresenta especificidade alta (~100%), porém uma sensibilidade va-

riável. Quando a amostra clínica é coletada de conteúdo vesicular, a sensibilidade pode ser maior que 90%, e maior do que 95% quando o material é colhido em úlceras. A sensibilidade é baixa especialmente em lesões recorrentes e declina significativamente à medida que as lesões começam a cicatrizar, podendo chegar a 30% em amostra colhida de mucosa sem lesão (OMS, 2014). A cultura viral é laboriosa, de custo elevado e, o resultado do exame pode variar de 2 a 7 dias (OMS, 2014). Além das condições de armazenamento e transporte da amostra influenciam na sensibilidade do exame (OMS, 2014).

A detecção citológica de alterações celulares associadas à infecção por HHV é um método de baixa sensibilidade e inespecífico para o diagnóstico de lesões genitais e, portanto, não é recomendado (MMWR, 2015). O Papanicolau, a coloração de Romanovsky e o esfregaço de Tzanck devem ser realizados em lesões recentes, e apesar de apresentarem baixo custo, apresentam baixa sensibilidade e especificidade (OMS, 2014). O ensaio de imunofluorescência direta apresenta uma sensibilidade média de 70-90% em amostra colhida de úlcera genital, e em pacientes assintomáticos, menor que 40 a 50% (OMS, 2014). Sua especificidade é alta (>95%) e é um teste rápido (viável em menos de 4 horas), porém, é um método laborioso, que apresenta sensibilidade abaixo dos valores ótimos, e deve ser feito a partir de vesículas recentes (OMS, 2014).

Os anticorpos específicos para HHV 1 e 2 quanto os comum a ambos HHV se desenvolvem durante as primeiras semanas após a infecção e persistem indefinidamente. Ensaios sorológicos precisos específicos para o HHV são baseados na glicoproteína G2 (HHV2) e na glicoproteína G1 (HHV1). As sensibilidades desses testes específicos para glicoproteína G para a detecção do anticorpo HHV2 variam de 80% a 98%; resultados falso-negativos podem ser mais frequentes nos estágios iniciais da infecção (MMWR, 2015). O teste mais comumente usado é o HerpeSelect® HHV2 ELISA, que pode ser falsamente positivo em valores de índice baixos (1.1–3.5) (MMWR, 2015). Esses valores baixos devem ser confirmados com outro teste, como o Biokit® ou o Western blot. O HerpeSelect® HHV2 immunoblot não deve ser usado para confirmação, porque utiliza o mesmo antígeno que o ELISA HHV2. A repetição do teste é indicada se houver suspeita de aquisição recente de herpes genital. O HerpeSelect® HHV1 ELISA é insensível para a detecção do anticorpo HHV1. O teste de IgM para HHV 1 ou HHV2 não é útil, porque os testes de IgM não são específicos e podem ser positivos durante episódios recorrentes de herpes genital ou oral (MMWR, 2015).

Como a maioria das infecções por HHV2 são adquiridas sexualmente, a presença de anticorpos específicos contra HHV2 implica em infecção anogenital. Neste caso, a educação e

o aconselhamento apropriados para pessoas com infecções genitais por HHV devem ser fornecidos (MMWR, 2015). A presença do anticorpo HHV1 sozinho é mais difícil de interpretar. Muitas pessoas com o anticorpo HHV1 têm infecção por HHV oral adquirida durante a infância, que pode ser assintomática. No entanto, a aquisição do HHV1 genital está aumentando e o HHV1 genital também pode ser assintomático. A falta de sintomas em uma pessoa soropositiva para HHV1 não distingue infecção anogenital de infecção orolabial ou cutânea, e independentemente do local da infecção, essas pessoas permanecem em risco de adquirir o HHV2 (MMWR, 2015).

Testes sorológicos específicos para HHV podem ser considerados em alguns casos: i) pacientes com sintomas genitais recorrentes ou sintomas atípicos com PCR ou cultura de HHV negativa; ii) casos de diagnóstico clínico de herpes genital sem confirmação laboratorial e; iii) paciente cujo parceiro sexual é infectado pelo vírus. Os ensaios sorológicos para HHV devem ser considerados também em pacientes com infecção pelo HIV e homens que têm relações sexuais com homens (MMWR, 2015).

Testes sorológicos específicos para cada tipo podem ser úteis para identificar mulheres gestantes com risco de infecção por HHV e orientar o aconselhamento sobre o risco de adquirir herpes genital durante a gravidez. Por exemplo, tais testes poderiam ser oferecidos a mulheres sem história de herpes genital cujo parceiro sexual tem infecção por HHV (MMWR, 2015).

A utilização de testes moleculares de amplificação do DNA viral surgiu como um método alternativo, uma vez que estes métodos são até quatro vezes mais sensíveis e mais rápidos que o isolamento e cultivo viral e menos dependente das condições de coleta e transporte (OMS, 2014). Estes métodos moleculares, tais como a PCR em tempo real, apresentam uma alta sensibilidade (98%), permitem uma análise quantitativa, e, além disso, possibilitam a realização de estudos de genotipagem e de resistência a antivirais. Atualmente, os NAAT são os testes mais sensíveis para detectar HHV em amostras genitais. As taxas de detecção dos ensaios de PCR são 11-71% superiores à cultura viral (OMS, 2014).

Segundo diretrizes da OMS o tratamento para adultos e adolescentes com um primeiro episódio clínico de infecção genital por HHV, sugere uma dose padrão de aciclovir em relação ao valaciclovir ou ao famciclovir. Para adultos e adolescentes com um episódio clínico recorrente de infecção genital por HHV, a diretriz de IST da OMS sugere tratamento que deve ser administrado nas primeiras 24 horas após o início dos sintomas ou durante a fase prodrômica.

Esta recomendação também se aplica a pessoas vivendo com HIV, pessoas imunocomprometidas e gestantes (OMS, 2016d).

A infecção pelo herpes genital causa um sofrimento psicopatológico substancial devido à sua natureza recorrente e dolorosa, especialmente em jovens (OMS, 2007). É de fundamental importância que o diagnóstico desta patologia seja assertiva, pois como se trata de uma infecção que não tem cura, nos episódios recorrentes indivíduos infectados podem transmitir o vírus para indivíduos saudáveis. Sabendo do diagnóstico medidas preventivas e de educação sexual podem ser tomadas para que não haja transmissão deste patógeno (MMWR, 2015).

### 2.3 Considerações sobre a validação do ensaio de PCR em tempo real

O termo validação refere-se ao processo de estabelecimento de características de desempenho analítico no momento de desenvolvimento de um ensaio. Testes que são verificados ou validados, devem conter controles e avaliação da qualidade (BURD, 2010). Para se validar um método de diagnóstico *in house* de PCR *Multiplex* em tempo real vários parâmetros precisam ser avaliados. Somente quando os critérios predeterminados são cumpridos, um método pode ser adotado para análise na rotina laboratorial e pode ser considerado validado completamente (BROEDERS *et al*, 2014).

Na validação analítica os parâmetros a serem avaliados são:

Eficiência da PCR: ensaios de PCR robustos e precisos são geralmente correlacionados com alta eficiência de PCR. Idealmente, a eficiência (E) de uma PCR deve ser de 90-110%, o que significa que o DNA alvo (*template*) dobra após cada ciclo térmico durante a amplificação exponencial (BURD, 2010). Uma eficiência de PCR de 100% corresponde a uma inclinação de -3,32, conforme determinado pela seguinte equação:

$$\text{Eficiência} = 10^{(-1 / \text{declive})} - 1$$

Limite de detecção (LOD): expressa a sensibilidade analítica do ensaio. O LOD é definido como a menor concentração (cópias de DNA/ $\mu\text{L}$ ) na qual 95% das amostras positivas são detectadas em um determinado procedimento analítico (BUSTIN *et al*, 2009).

Precisão: medição da reprodutibilidade e da repetibilidade de um teste, e é baseado na aplicação do mesmo repetidamente em tempos e condições operacionais diferentes. Este parâmetro também pode ser definido como o nível de concordância de resultados individuais

dentro de uma única corrida (precisão intra-ensaio) e entre corridas diferentes (precisão inter-ensaio). A precisão está inteiramente relacionada ao erro aleatório causado por fatores que variam durante a operação do ensaio, como por exemplo, tempo, temperatura, pipetas, instrumentos, etc. As diferenças nas técnicas de operadores individuais também podem introduzir variações aleatórias consideráveis (BURD, 2010).

Especificidade analítica: capacidade de um ensaio em detectar apenas o alvo de interesse não sendo afetada pela reatividade cruzada de ácidos nucleicos relacionados ou potencialmente interferentes ou condições relacionadas a espécimes. Os dois aspectos da especificidade analítica são a reatividade cruzada e a interferência. Microrganismos que devem ser testados para excluir a potencial reatividade cruzada incluem microrganismos habituais da microbiota que podem estar presentes simultaneamente na amostra, organismos com estrutura genética similar e organismos que causam sintomas semelhantes ou coinfeções clinicamente relevantes (BURD, 2010). Substâncias interferentes são compostos diferentes do analito em questão que podem estar presentes na amostra analisada. Estas substâncias têm o potencial de afetar a atividade da polimerase e interferem com ou inibem a amplificação do ácido nucleico, afetando a precisão de medição do analito de interesse. Os espécimes de qualquer fonte podem conter quantidades imprevisíveis destas substâncias, que podem ser originárias de fontes endógenas como hemoglobina, medicamentos, álcool, etc. e exógenas. Os contaminantes exógenos podem ser introduzidos inadvertidamente durante a coleta de amostras vindo de fontes, tais como creme para mãos, uso de medicamentos tópicos, pó (talco) presente em alguns tipos de luvas, etc (BURD, 2010).

Segundo a NORMA PALC (Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos) - Lista de Verificação em Diagnóstico Molecular - Versão 2008, os parâmetros a serem analisados para os métodos próprios (*in house*), deve haver documentação e registro dos estudos de validação das características de desempenho realizados antes da sua implantação que incluam, quando aplicável:

- sensibilidade diagnóstica (clínica);
- sensibilidade analítica;
- especificidade diagnóstica (clínica);
- especificidade analítica;
- precisão;
- linearidade (ensaios quantitativos);
- faixa reportável de resultados de pacientes;

- intervalo de referência;
- qualquer outra característica de desempenho aplicável.

Para métodos próprios (*in house*) para testes genéticos os protocolos de validação devem incluir a documentação de:

- acurácia;
- sensibilidade analítica;
- especificidade analítica;
- precisão;
- características clínicas de desempenho

(revisões da literatura científica em publicações revistas por pares ou sumário dos dados de estudos próprios).

- um número representativo de cada tipo de amostra que será analisada;
- a comparação de resultados obtidos pelo método teste com resultados obtidos por um método comparativo válido ou por meio de validação clínica.

### 3 Justificativa

É estimado que mais de 357 milhões de novos casos de Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) curáveis ocorram anualmente ao redor do mundo, sendo a maior incidência em países em desenvolvimento e, entre indivíduos com idade entre 15 e 49 anos. Seis milhões de casos de sífilis correm anualmente e a prevalência de algumas infecções virais sexualmente transmissíveis é similarmente alta. Cerca de 417 milhões de pessoas entre 15 e 49 anos em todo o mundo são infectadas com HHV 2 e 3,7 bilhões de pessoas com idade inferior a 50 anos são infectadas por HHV 1 globalmente. As ISTs representadas pelas úlceras genitais geram impactos na qualidade de vida de adultos, jovens e crianças, acarretando em consequências físicas, psicológicas e sociais. Os aspectos clínicos das úlceras genitais são variados e têm baixa relação de sensibilidade e especificidade com o agente etiológico, mesmo nos casos considerados clássicos. Assim, o diagnóstico médico, baseado unicamente no exame físico e no histórico do paciente é frequentemente impreciso, devido, principalmente à similaridade do aspecto das lesões causadas por diferentes agentes etiológicos. Desta forma a disponibilidade de um teste laboratorial, rápido, sensível e específico se faz necessária, permitindo o correto diagnóstico das ISTs, favorecendo o correto tratamento e/ou controles destas. A escolha do tema do presente projeto de pesquisa, em âmbito do mestrado profissional, foi baseada em critérios de inovação biotecnológica e mercadológica, contribuição do tema para a sociedade e aplicabilidade. Para se avaliar o critério de inovação tecnológica e mercadológica, foi realizado um levantamento para se estimar quais exames são oferecidos para o diagnóstico dos principais agentes etiológicos causadores de úlceras genitais: *T. pallidum* e HHV 1 e 2. Esta pesquisa foi realizada nos principais laboratórios do Brasil: DASA, DB Diagnósticos, Fleury, Sabin (Apêndice A). Nenhum dos laboratórios nacionais oferece o exame de diagnóstico proposto neste projeto pela metodologia de PCR em tempo real *Multiplex*. Além disso, foi realizada uma busca no banco de dados de patentes nacionais, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), e não foi encontrado nenhum título de propriedade industrial depositado relacionado ao diagnóstico baseado no método de PCR em Tempo Real *Multiplex* para a detecção dos patógenos em questão neste estudo. O produto gerado neste projeto servirá para atender as necessidades da comunidade médica e de pacientes que necessitam de métodos de diagnóstico para identificar os agentes infecciosos destas doenças com rapidez e precisão, permitindo a distinção dos patógenos no início da infecção e consequentemente permitindo

que o tratamento apropriado seja implantado rapidamente, diminuindo o custo do exame, sendo menos oneroso para o sistema de saúde. Além disso, este projeto contribuirá para um maior crescimento científico e econômico da empresa na área de diagnóstico de doenças infecto-contagiosas, beneficiando a saúde pública regional e nacional.

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo geral

Desenvolver métodos de diagnóstico *in house* por PCR em Tempo Real para a detecção dos agentes etiológicos causadores de ulcerações genitais, *T. pallidum* e Herpesvírus humano 1 e 2.

### 4.2 Objetivos específicos

- padronizar um PCR em Tempo Real qualitativo *Singleplex* para detecção de *T. pallidum*;
- padronizar um PCR em Tempo Real *Multiplex* qualitativo para detecção de *T. pallidum* e Herpesvírus humano 1 e 2;
- Selecionar e estudar os iniciadores e sondas específicos e com características adequadas;
- Avaliar a metodologia proposta com amostras clínicas.

## 5 Material e métodos

### 5.1 Considerações éticas

O presente projeto foi submetido para análise e aprovado pelo comitê de ética do CEP Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), número CAAE 70135917.9.0000.5149.

### 5.2 Local de Realização do Experimento

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Molecular do Instituto Hermes Pardini, localizado no Núcleo Técnico Operacional de Vespasiano, Minas Gerais.

### 5.3 Controles

Para a padronização das PCRs *Singleplex* e *Multiplex*, foram utilizados como controles positivos os DNAs genômicos sintéticos comerciais (Vircell, Granada, Espanha) dos microrganismos: *T. pallidum* (MBC109), HHV 1 (Herpes simplex 1-MBC023), HHV2 (Herpes simplex 2-MBC024). Todos os controles foram recebidos na forma liofilizada e foram reconstituídos em 500 µL no tampão de reconstituição do kit de acordo com as orientações do fabricante e armazenados a -20°C. Todos os controles utilizados são quantificados pelo fabricante em cópias de DNA por µL.

Em todas as reação de PCR foram incluídos controles sem DNA alvo (NTC: *no template control*), mas contendo todos os reagentes da reação. Para se evitar riscos de contaminação das reações, foram utilizados espaços físicos diferentes para cada etapa do processo (preparo dos reagentes, extração das amostras clínicas e amplificação). Também foram empregados materiais descartáveis “DNase” e “RNase - free”, além de micropipetas, aventais e luvas descartáveis específicos de cada uma das áreas físicas (MITCHELL *et al*, 2011).

Iniciadores e sondas (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América) tendo como alvo o gene da RNase P foram usados para o controle endógeno, para controle do processo de extração e avaliação de atividade inibitória (CHEN, BALLARD, 2012). A utilização

do controle endógeno RNase P teve por objetivo assegurar que as amostras de DNA extraídas estivessem em condições de serem amplificadas, ou seja com a quantidade tolerável de inibidores da PCR. Estas reações foram realizadas na mesma placa em que foi realizado o PCR *Multiplex*.

#### 5.4 Seleção de iniciadores e sondas específicos

A partir de uma revisão da literatura científica (GLATZ *et al*, 2014; CHEN, BALLARD 2012; ORLE *et al*, 1996; SUNTOKE *et al*, 2009; NAVECA *et al*, 2013; BRUISTEN *et al*, 2000; COREY *et al*, 2005) foi definido como artigo de referência para o trabalho os iniciadores e sondas dos autores Chen e Ballard (2012) e Corey e colaboradores (2005) (Tabela 2).

**TABELA 2: Iniciadores e sondas utilizadas neste estudo.**

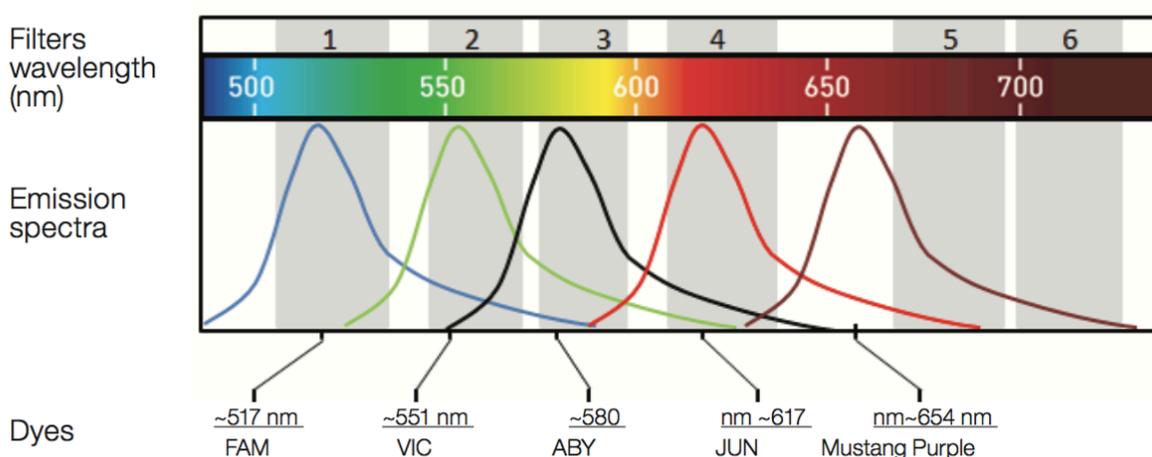
Agente infeccioso/ alvo	Identificação dos iniciadores e sondas	Sequência (5' para 3')	Autores	Tamanho do fragmento (pb)
<i>T.pallidum</i>	FP (FPtpn 47) RP (RPtpn 47) Sonda (tpn 47)	CAACACGGTCCGCTACGACTA TGCCATAACTCGCCATCAGA ACGGTGATGACGCGAGCTACACCA	Chen, Ballard (2012)	67
HHV	FP(GbTypF) RP (GbTypR) Sonda HHV 1(Gb Typ1) Sonda HHV 2(Gb Typ2)	CGCATCAAGACCACCTCCTC GCTCGCACCACGCGA TGGCAACGCGGCCCAAC CGGCGATGCGCCCCAG	Corey (2005)	99 113
RNase P	FP RP Sonda	CCAAGTGTGAGGGCTGAAAAG TGTTGTGGCTGATGAACTATAAAAGG CCCCAGTCTCTGTCAGCACTCCCTTC	Chen, Ballard (2012)	-

FP: iniciador senso; RP: iniciador anti-senso; Sondas utilizadas: *T. pallidum*: FAM; HHV 1: VIC, HHV 2: JUN. Tm: Temperatura de *melting*. GC: Conteúdo de Citosina e Guanina  
Fonte: Adaptado de Chen, Ballard (2012) e Corey (2005).

Programas que prevêm o comportamento destes iniciadores nas reações foram utilizados, tais como AutoDimer (2014) e Iniciador Express 3. A confirmação da ocorrência de hibridização e a especificidade dos pares de iniciadores foram feitas por análise *in silico*, com o auxílio

do programa BLAST (*Basic Local Alignment Tool*), opção BLASTn (ALTSCHUL *et al*, 1990). O tamanho dos iniciadores (em pares de base), o conteúdo de G+C e temperatura de dissociação dos iniciadores, formação de *hairpin* e hetero-dímeros, complementariedade entre os iniciadores, tamanho do produto gerado, o “E value” e o “query cover” também foram avaliados. Após a avaliação, os iniciadores e sondas específicos foram sintetizados por empresas especializadas (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América), e então foram recebidos liofilizados e reconstituídos de acordo com instruções do fabricante (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América). Os iniciadores foram reconstituídos para a concentração de 100  $\mu\text{M}$  e armazenados a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Aliquotas de uso foram diluídas na concentração final de 10  $\mu\text{M}$ . As sondas foram igualmente aliquotadas na concentração final de 10  $\mu\text{M}$  e armazenadas em tubos protegidos da luz, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Os fluoróforos de cada sonda foram escolhidos de forma a permitir sua detecção na mesma reação apresentando diferentes comprimentos de onda para sua detecção (Figura 4). Foi utilizado o fluoróforo FAM para marcação da sonda específica para o *T. Pallidum*, para a sonda de HHV 1 foi usado o fluoróforo VIC, e para a sonda específica de HHV2 foi usado o fluoróforo JUN. Para o controle interno RNase P foi utilizado o fluoróforo FAM. Em todas as sondas, o *quencher* utilizado foi amina-reativa (QSY).



**Figura 5: Espectro de emissão de fluorescência dos fluoróforos FAM, VIC, e JUN usados para a PCR *Multiplex* em tempo real.** Fonte: Thermo Fisher Scientific (2016).

## 5.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em Tempo Real

As PCRs em tempo real foram realizadas em um termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), empregando-se o sistema de detecção por sondas complementares (TaqMan® Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA). Foi utilizado o kit Master Mix Universal TaqMan® (Thermo Fischer Scientific, Warrington, UK) nas reações de *Singleplex* do *T.pallidum*. E nas reações de *Multiplex* e *Singleplex* contendo o HHV foi utilizado o TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América) que possui como referência passiva o Mustang Purple® (Thermo Fisher). O Mustang Purple® é usado no lugar do ROX™ para permitir o uso do fluoróforo JUN® que é detectado pelo mesmo canal do ROX™. Ambos Master Mix contém UDG (Uracil-N-glycosylase) que é utilizada para prevenir a contaminação e reamplificação com produtos de PCR gerados em outras reações (*carryover*).

Grande parte dos experimentos foram realizados em triplicata. Alguns foram realizados em duplicatas ou simplicata devido ao baixo volume de controle positivo disponível no laboratório. Em todas as reações *Singleplex* foram utilizados 12,5 µL de Master Mix e variações na concentração dos DNAs controle, iniciadores e sondas foram feitas para a padronização da reação. As reações tinham volume final de 25 µL, completados com água ultra pura esterilizada, e foram realizadas em placas de 96 poços e cobertas com filme óptico, ambos específicos/compatíveis para o termociclador (Applied Biosystems, EUA). Os resultados foram analisados com o auxílio do software 7500 Fast v 2.01 (Applied Biosystems, EUA).

Os ciclos de amplificação foram padronizados a partir de um ciclo inicial, composto de (i) incubação a 50°C por 2 minutos. Nesta etapa ocorre a ativação da enzima UNG. Esta enzima é utilizada em PCR em tempo real para evitar o carregamento de contaminação com DNA contendo dU oriundo de reações anteriores, ela degrada qualquer produto de PCR contaminante contendo uracila, deixando inalterada a matriz de DNA alvo (contendo timina); (ii) incubação inicial a 95 °C por 10 minutos (nesta etapa ocorre a inativação da enzima UDG e desnaturação do DNA alvo); (iii) 45 ciclos de 20 segundos a 95°C (desnaturação), 1 minuto a 60°C (pareamento e extensão).

Nas reações tendo como alvo o gene da RNase P foram utilizados 12,5 µL de TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América), 0,5µM dos iniciadores e 0,18µM da sonda marcada com o fluoróforo FAM.

### 5.5.1 Padronização da PCR em Tempo Real *Singleplex T.pallidum*

Para a padronização dos testes da PCR em Tempo Real *Singleplex* para *T. pallidum* foram utilizadas variações nas concentrações dos iniciadores senso e anti-senso (300 nM, 600nM e 900 nM) para se alcançar condições ótimas de cada reação (Quadro 2). Foram escolhidas as concentrações que demonstraram o menor valor de Ct.

**QUADRO 2: Matriz de iniciadores: concentrações de iniciadores senso e anti-senso testadas nas PCRs de *T.pallidum***

Iniciador Senso (nM)	Iniciador Anti-senso (nM)		
	300	600	900
300	300/300 (MIX I) <sup>a</sup>	300/600 (MIX II)	900/300 (MIX III)
600	300/600 (MIX IV)	600/600 (MIX V)	900/600 (MIX VI)
900	300/900 (MIX VII)	600/900 (MIX VIII)	900/900 (MIX IX)

<sup>a</sup>: Denominação de soluções dos iniciadores relacionadas às diferentes concentrações utilizadas nas reações de PCR em tempo real.

Fonte: Thermo Fisher Scientific

A eficiência da PCR e o limite de detecção (LOD) foram avaliados após a definição da concentração ideal dos iniciadores. A detecção do LOD foi realizada diluindo-se o DNA do controle positivo comercial em 6 pontos.

### 5.5.2 Padronização da PCR em Tempo Real *Singleplex HHV*

Após a revisão bibliográfica, foram escolhidos os iniciadores para o HHV1 e HHV2, conforme Chen e Ballard (2012). Foram realizados experimentos como reações com diluições do DNA em 7 pontos e matriz de iniciadores. Entretanto, optou-se por utilizar os iniciadores que já são empregados na rotina do Instituto Hermes Pardini (IHP) para a detecção do HHV, segundo Corey e colaboradores (2005) (Tabela 4). Na padronização *in house* dos inici-

adores segundo Corey e colaboradores (2005), foram realizados previamente pelo IHP testes para a definição do LOD, testes de especificidade, testes de comparabilidade entre Nested-PCR e PCR em Tempo Real e validação com amostras clínicas.

### **5.5.3 Desenvolvimento da PCR em Tempo Real *Multiplex***

Para a realização dos testes, foram utilizadas as concentrações de 300 nM de todos os iniciadores senso e anti-senso e de 100nM para todas as sondas. Foram empregados os seguintes parâmetros para amplificação: (i) incubação a 50°C por 2 minutos, (ii) incubação inicial a 95 °C por 10 minutos, (iii) 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C. Para se avaliar possíveis interferentes ou inibidores entre os iniciadores, as sondas e os controles positivos, foram realizadas reações cruzadas conforme tabela 3.

**TABELA 3: Reações entre iniciadores, sondas e *template* para padronização de PCR Multiplex**

Inciadores e Sondas	DNA ( <i>Template</i> ) utilizado na reação
<i>T.pallidum</i>	HHV1
	HHV 2
	HHV 1 + HHV2
	HHV 1 + HHV2 + TP
HHV 1	HHV1
	HHV 2
	HHV 1 + HHV2
	HHV 1 + HHV2 + TP
HHV 2	HHV1
	HHV 2
	HHV 1 + HHV2
	HHV 1 + HHV2 + TP
<i>T.pallidum</i> HHV 1 HHV 2	HHV1
	HHV 2
	HHV 1 + HHV2
	HHV 1 + HHV2 + TP

HHV: Herpesvírus humano; TP: *T. pallidum*; FP: iniciador senso; RP: iniciador anti-senso;

Concentrações utilizadas: 300 nM para os iniciadores senso e anti-senso e de 100nM para as sondas. Número de cópias de DNA: 162 cópias/ $\mu$ L;

Termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), empregando-se o sistema de detecção por sondas complementares (TaqMan® Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) e TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América);

Ciclagem utilizada: incubação a 50°C por 2 minutos, (ii) incubação inicial a 95 °C por 10 minutos, (iii) 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.

#### 5.5.4 Amostras

Foram analisadas 88 amostras de secreção vaginal e uretral recebidas pelo setor de Genética do Instituto Hermes Pardini para a pesquisa de patógenos causadores de infecções sexualmente transmissíveis. O DNA total foi extraído destas amostras através do método automatizado Abbott® m2000sp segundo as instruções do fabricante. Um volume de 1 µL de material proveniente da extração de DNA foi usado em cada reação *Multiplex* para detecção de *T.pallidum*, HHV 1 e HHV 2.

## 6 Resultados e discussão

### 6.1 Seleção dos iniciadores e das sondas

Após estudar e fazer a análise através de programas como Blast e AutoDimer, os iniciadores e sondas utilizados por alguns autores (GLATZ *et al*, 2014; CHEN, BALLARD 2012; ORLE *et al*, 1996; SUNTOKE *et al*, 2009; NAVECA *et al*, 2013; BRUISTEN *et al*, 2000; COREY *et al*, 2005) e suas possíveis interações na reação de PCR *Multiplex*, para a detecção de úlceras genitais, foi definido para o *T. pallidum* os iniciadores dos autores Chen e Ballard (2012) e para o HHV 1 e HHV 2 dos autores Corey e colaboradores (2005).

Os iniciadores específicos para *T. pallidum* tem como alvo o gene que codifica para a lipoproteína de membrana 47-kDa.

Os iniciadores e a sonda tem tamanhos diferentes variando de 20 a 24 bases, com conteúdo de GC de 50 a 67,95% (Tabela 4). Os iniciadores para HHV1 e HHV2 têm como alvo o gene que codifica para a glicoproteína B (gB) com tamanho de 15 e 20 bases. A sonda específica para HHV 1 tem tamanho de 17 bases e a sonda para para HHV 2 tem tamanho de 16 bases, com conteúdo de GC que varia de 60 a 81%.

**TABELA 4: Iniciadores e sondas utilizadas neste estudo demonstrando os parâmetros avaliados.**

Agente infeccioso/alvo	Identificação dos iniciadores e sondas	Sequência (5' para 3')	Fragmento (pb)	Tm (°C)	Conteúdo GC %	E-value	Query cover
<i>T.pallidum</i>	FP (FPtpn 47) RP (RPtpn 47) Sonda (tpn 47)	CAACACGGTCCGCTACGA	67	62,3	57	0,071	100%
		CTA		59,5	50	0,28	100%
		TGCCATAACTCGCCATCA		67,9	58	0,002	100%
		GA					
		ACGGTGATGACGCGAGCT					
		ACACCA					
HHV	FP (GbTypF) RP (GbTypR) Sonda HHV 1 (Gb Typ1) Sonda HHV 2 (Gb Typ2)	CGCATCAAGACCACCTCC	99 113	60,8	60	0,29	100%
		TC		61,6	73	276	100%
		GCTCGCACCACGCGA		65,1	71	18	100%
		TGGCAACGCGGCCAAC		65,2	81	70	100%
		CGGCGATGCGCCCCAG					

FP: iniciador senso; RP: iniciador anti-senso; Sondas utilizadas: *T. pallidum*: FAM; HHV 1: VIC, HHV 2: JUN. Tm: Temperatura de *melting*. GC: Conteúdo de Citosina e Guanina

Fonte: Adaptado de Chen, Ballard (2012) e Corey (2005).

A temperatura de *melting* variou de 59,5 e 62,3°C para os iniciadores, e entre as sondas oscilou entre 65,1 e 67,9°C. Foram observados poucos *hairpins* do tipo hetero ou homodímeros com delta G (dG) com valores acima de -9 kcal/mole. Em termos simples, dG representa a quantidade de energia necessária para quebrar completamente uma estrutura secundária de DNA. Quanto menores os valores de dG (valores mais negativos), maior a quantidade de energia necessária para "separar" as fitas de DNA se uma estrutura secundária (um dímero de primer ou hairpin, por exemplo) é formada. Isso é muito importante na reação de PCR porque, nesses casos, a energia é dada para a temperatura. Se seus primers têm valores muito negativos de dG, a quantidade de energia necessária para quebrar o dímero é maior, ou seja necessário temperaturas mais altas, o que pode dificultar a reação. Em termos gerais, valores de dG mais positivos que -9 kcal/mol são aceitáveis.

A complementariedade entre as sondas e os iniciadores foi detectada com Pontuação 5. A Pontuação dada para cada interação é um critério usado para julgar o grau de complementariedade. A Pontuação reflete a estabilidade geral ou tendência de uma potencial interação existir em solução. Um valor de pontuação é determinado pela combinação do número de pares de bases de Watson-Crick (+1) com *mismatches* (-1) e o índice ajustado pelo programa AutoDimer é 7. A pontuação de 7 ou 8 funciona bem ao projetar iniciadores para PCR *Multiplex* (VALLONE, BUTLER, 2004). Logo, os iniciadores e as sondas utilizados nesse estudo mostraram a pontuação 5, demonstrando ter poucas interações entre as sequências utilizadas. Assim, o valor de 5 não é representativo, indicando a compatibilidade dos iniciadores e/ou sondas.

O estudo de especificidade mostrou que as sequências dos iniciadores apresentaram uma similaridade de 100% somente com o *T. pallidum*, sendo o "E-value" de 0,071 para o FP (tpn 47), sendo o "query cover" de 100% somente para a espécie de *T. pallidum*. O valor de Expectativa ou "E-value" representa o número de alinhamentos diferentes com pontuações equivalentes que se espera que ocorram em uma pesquisa de banco de dados por acaso. Quanto menor o "E-value", mais significativa é a pontuação e o alinhamento (BLAST, NCBI, 2017). Ou seja, significa o número de sequências de um banco de dados, que ao acaso teria similaridade com a sequência em estudo. Quanto maior a pontuação, mais ela é encontrada em outros microrganismos, e quanto menor o "E-value" mais específica da sequência do microrganismo de interesse utilizada no alinhamento daquela sequência ao acaso.

O RP tpn 47 (iniciador anti-senso para *T.pallidum*) apresentou “E-value” de 0,28, sendo o “query cover” de 100% somente para a espécie de *T. pallidum*. Para a sonda tpn 47( sonda para *T.pallidum*) o “E-value” foi de 0,002, sendo o “query cover” de 100% somente para a espécie de *T. pallidum*.

O estudo de especificidade mostrou que as sequências dos iniciadores para HHV apresentaram uma similaridade de 100% somente com os microrganismos de interesse para o iniciador senso, sendo o “E-value” de 0,29 para o FP GbTypF (iniciador senso para HHV), sendo o “query cover” de 100% somente para as espécies *Human alphaherpesvirus 1 e 2*.

O iniciador RP GbTypR (iniciador anti-senso para HHV) apresentou “E-value” de 276, sendo o “query cover” de 100% para diferentes espécies: *Human alphaherpesvirus 1 e 2*, *Deinococcus sp*, *Sphingomonas sp*, *Corynebacterium glutamicum*, *Xanthomonas fragariae*. A sonda para HHV 1 (Gb Typ1) apresentou “E-value” de 18 e o “query cover” de 100% para a espécie: HHV 1, *Sinorhizobium meliloti*, *Medicago sativa* e *Acidobacteria bacterium*. A sonda para HHV 2 (Gb Typ2) apresentou “E-value” de 70 e o “query cover” de 100% para o HHV 2 e várias espécies: *Cupriavidus sp*, *Achromobacter spanius*, *Pseudomonas sp*, *Vibrio diabolicus*, *Pseudomonas fulva*, *K. aerogenes*, *Bordetella pertussis*, *Phaeobacter piscinae* entre outras.

Para a padronização deste método em estudo, foram utilizados controles comerciais sintéticos quantificados em cópias de DNA/ $\mu$ L. Os controles comerciais apresentam a vantagem de serem quantificados em cópias de DNA/ $\mu$ L que é fundamental para o processo de validação para se avaliar a sensibilidade do método de diagnóstico. As características ótimas dos iniciadores estão bem definidas na literatura, podendo variar de acordo com cada experimento (BURD, 2010).

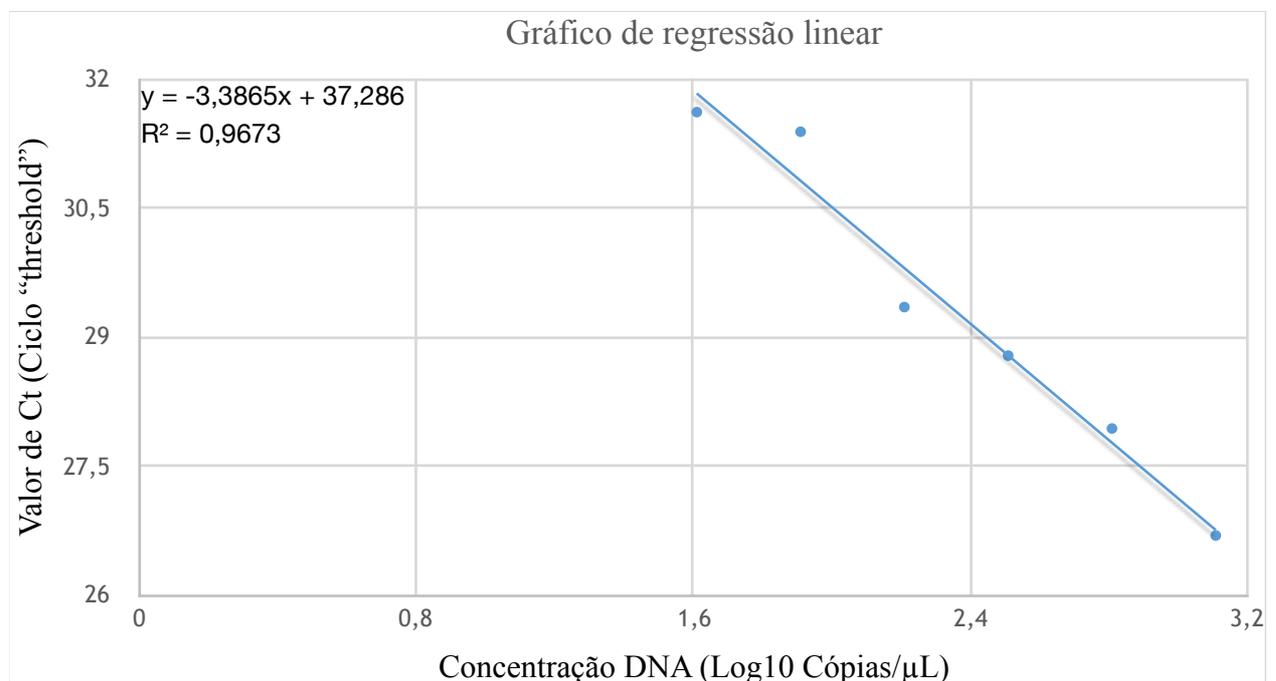
## 6.2 Desenvolvimento da PCR em Tempo Real *Singleplex T.pallidum*

Para *T. pallidum*, as concentrações ideais de iniciadores foram 0,3  $\mu$ M para o iniciador senso e anti-senso, quando foi observada a detecção de amplificação no Ct de 28,78, utilizando-se 325 cópias de DNA/mL/reação. Para se determinar o LOD, foram utilizadas alíquotas de diferentes concentrações, variando de 1.300 cópias de DNA/uL a 40,62 cópias de DNA/uL (Quadro 5), usando a suspensão de DNA genômico do controle comercial de *T. pallidum* (Vir-

cell, Granada, Espanha) (Figura 6, Figura 7). A curva padrão utilizada nos ensaios utilizando o sistema TaqMan®, apresentou inclinação de -3,76, R<sup>2</sup> de 0,97 e eficiência de 84%.

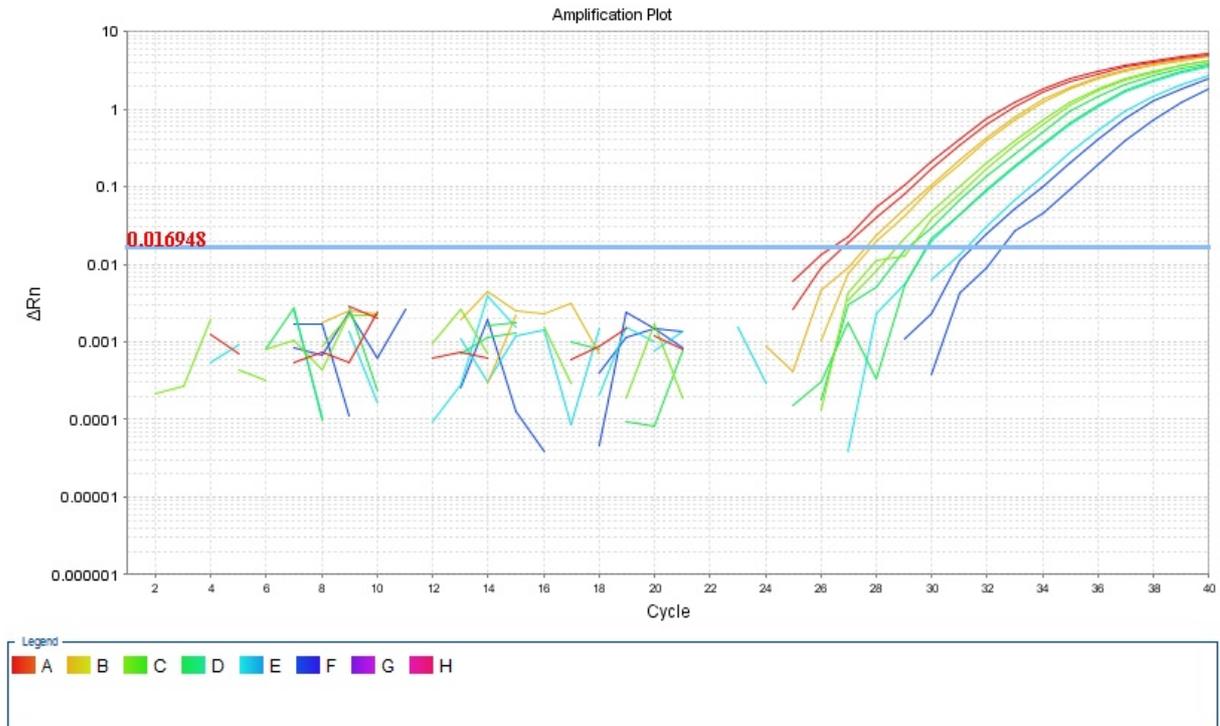
**Quadro 5: Concentrações de diluições seriadas do DNA com 6 pontos de diluição e valores de Ciclo “threshold” (Ct) de *T. pallidum*.**

Cópias/ $\mu$ L	Ct (média de 2 poços)
1300	26.69
650	27.94
325	28.78
162.5	29.35
81.25	31.39
40.62	31.62



**Figura 6: Gráfico de regressão linear mostrando a curva padrão Ct x Log de diluição do DNA da reação de PCR para detecção *T. pallidum* com 6 pontos de diluição. Apresentando uma inclinação de -3,76, R<sup>2</sup> de 0,97 e eficiência de 84%. O eixo x apresenta o valor de CT e o eixo y a concentração de DNA em cópias/ $\mu$ L na base Log10 . Foi utilizado DNA genômico do controle comercial de *T. pal-***

*lidum* (Vircell, Granada, Espanha) diluído em 6 concentrações conforme quadro 6. Foi utilizado Master Mix Universal TaqMan® (Thermo Fischer Scientific, Warrington, UK). Marcação da sonda: FAM. Referência passiva: ROX® (Thermo Fisher). Ciclagem utilizada: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.



**Figura 7: Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real para a definição do LOD do *T. pallidum* com 6 pontos de diluição em duplicata.** Foi utilizado Master Mix Universal TaqMan® (Thermo Fischer Scientific, Warrington, UK) Marcação da sonda: FAM. Referência passiva: ROX® (Thermo Fisher). Ciclagem utilizada: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.

O LOD do *T.pallidum* foi estabelecido como 40,62 cópias de DNA/uL, entretanto a literatura relata valores 10 a 25 organismos (LIU *et al*, 2010), 1 a 10 cópias genômicas por reação (CHEN *et al*, 2006; OMS, 2014). Neste estudo foi alcançado um LOD de 20,31 cópias de DNA/uL, entretanto não foi possível fazer a repetição dos experimentos, para se avaliar a reprodutibilidade dos resultados, sendo mantido o LOD de 40,62 cópias de DNA/uL.

Este estudo teve como fator limitante para a continuidade dos experimentos a falta de controle positivo para *T.pallidum*. Em dado momento da pesquisa, as alíquotas do controle degradaram, mesmo sendo armazenados em alíquotas e em freezer -20 °C. Foram realizados testes com Sybr com todas as alíquotas do controle positivo e somente uma amplificou, sendo esta racionada para os testes da PCR *Multiplex*.

O estudo de especificidade mostrou que as sequências dos iniciadores e sondas do *T. pallidum* apresentaram uma similaridade de 100% somente com o *T. pallidum*. Estes iniciadores tem como alvo o gene que codifica para a lipoproteína de membrana 47-kDa. Recentemente, estudos mostraram que o gene 47-kDa ou o gene polimerase A (polA) tem um desempenho diagnóstico similar (GAYET-AGERON *et al*, 2015).

### 6.3 Desenvolvimento da PCR em Tempo Real *Singleplex* HHV

Inicialmente foram escolhidos os iniciadores para o HHV1 e HHV2, conforme Chen e Ballard (2012). Após alguns experimentos, observou-se que os iniciadores do HHV1 e HHV2 não demonstraram reprodutibilidade dos resultados, mesmo estando descritos na literatura. O HHV2 não mostrou amplificação, apesar das sequências terem sido alinhadas *in vitro*. Foram testadas diferentes alíquotas de controle positivo, sendo o DNA diluído em 1600 cópias/ $\mu$ L, 800, 400, 200, 100, 50 e 25 cópias/ $\mu$ L. Foram testados dois lotes diferentes de controle positivo comercial (Vircell, Espanha). Foram realizadas alterações nas concentrações dos iniciadores e da sonda para HHV2, entretanto não houve amplificação do DNA. Para o HHV1 foi realizada a matriz de iniciadores (Quadro 3) em três replicatas, e quatro reações utilizando as concentrações dos iniciadores segundo Chen e Ballard (2012). Foram realizadas diluições com diferentes concentrações de DNA: 1500, 750, 375, 187,5, 94, 47 e 23 cópias/ $\mu$ L. Contudo os resultados foram inconsistentes, não demonstrando reprodutibilidade dos resultados. Logo, optou-se por utilizar os iniciadores que já são utilizados na rotina do Instituto Hermes Pardini para a detecção do HHV, segundo Corey e colaboradores (2005) (Tabela 4). Entretanto, com a vantagem de serem usados na forma de *Multiplex* para a detecção de úlceras genitais.

As sondas utilizadas por Corey *et al* (2005) fazem a distinção entre os dois tipos virais HHV 1 e HHV2 demonstrando uma vantagem entre os iniciadores selecionados anteriormente. As manifestações clínicas das infecções por HHV1 e 2 muitas vezes se sobrepõem. Tanto HHV 1 como 2 podem ser isolados da mucosa, pele e órgãos viscerais (WHITLEY, ROIZMAN, 2001). No entanto, estudos delinearão diferenças na mortalidade, gravidade da infecção, na frequência de reativação clínica e subclínica, na resposta à antivirais e na probabilidade de desenvolver uma susceptibilidade reduzida aos análogos de nucleosídeos entre os dois

tipos de vírus (COREY *et al*, 2005). Logo, definir qual tipo é isolado de uma lesão mucosa é de relevância clínica e rotineiramente recomendado (COREY *et al*, 2005).

Os iniciadores e sondas para HHV 1 e 2 tem como alvo a região codificadora da proteína do gene da glicoproteína B (gB) do genoma do HHV 1 e do HHV 2. Vários estudos relatam o uso deste gene em reações de PCR para HHV 1 e 2 (SCOULAR, GILLESPIE, CARMAN, 2002; BRUISTEN *et al* 2001; SCOTT, *et al* 2010; ORLE *et al*, 1996). Foram analisados neste estudo, por análise *in silico*, a especificidade de ligação com os alvos e a possibilidade de ocorrência de *primer dimers* entre as combinações utilizadas nas reações *Multiplex*. Os iniciadores anti-senso para os HHV RP (GbTypR) mostraram na análise *in silico* especificidade para as espécies: HHV 1 e 2. Contudo os iniciadores também mostraram especificidade para outros microrganismos, como: *Deinococcus sp.*; *Sphingomonas sp.*; *Corynebacterium glutamicum*; *Celulosimicrobium cellulans*; *Xanthomonas fragariae*, entre outras espécies. O iniciador anti-senso RP (GbTypR) apresentou “Expected-value” de 276, sendo um valor alto e não representativo. Apesar dos iniciadores e sondas do HHV1 e HHV2 terem especificidade para outras espécies, o “E-value” apresentou um valor alto mostrando que o alinhamento deste iniciador com outras espécies não é significativo. Quanto menor o “E-value”, ou quanto mais próximo de zero, mais "significativo" é a probabilidade de ocorrer no banco de dados uma sequência com similaridade à sequência "query" puramente por acaso (Blast, NCBI). Além disso, os locais onde estas bactérias são comumente isoladas são incompatíveis com o local da coleta dos espécimes clínicos indicados neste trabalho. Como por exemplo, a espécie *Deinococcus sp* é isolada mundialmente de locais ricos em nutrientes orgânicos, incluindo solo, fezes de animais e processamento de carnes, bem como de ambientes secos, pobres em nutrientes (OWEN *et al*, 1999). Já a *Sphingomonas sp*, geralmente é isolada de sedimentos, principalmente areias de sedimentos da planície costeira atlântica e em sedimentos subterrâneos rasos (FREDRICKSON, 1999). A *Xanthomonas fragariae* é o agente causal da mancha angular bacteriana em morangos (OEPP/EPPO,2006). O *Corynebacterium glutamicum* é importante para a produção industrial de aminoácidos, como L-glutamato e L-lisina (LEE *et al*, 2016). O *Celulosimicrobium cellulans* raramente causa infecção em humanos, algumas infecções foram relatadas em hospedeiros imunocomprometidos ou em pacientes com corpos estranhos como cateteres (ROWLINSON *et al*, 2006).

A sonda para HHV1 (Gb Typ1) apresentou especificidade para HHV 1 além de outros organismos, tais como: *Sinorhizobium meliloti* e *Acidobacteria bacterium*. A bactéria *Sinorhizobium meliloti*, é isolada do solo e tem uma relação de simbiose com a planta hospedeira

*Medicago sativa* (GURICH, GONZALES, 2009). A *Acidobacteria bacterium* é abundante em uma variedade de ecossistemas, especialmente solos (KIELAK, 2016). Logo, apesar da sonda ter similaridade com sequências de outros organismos, estes são comumente isolados do solo, minimizando os riscos de resultados falso positivos, tendo em vista que as amostras clínicas indicadas nesta pesquisa são coletadas em úlceras genitais.

A sonda para HHV2 (Gb Typ2) apresentou “E-value” de 70, valor não representativo, e o “query cover” de 100% para o HHV2 e várias espécies: *Cupriavidus sp.*, *Achromobacter spanius*, *Pseudomonas sp.*, *Vibrio diabolicus*, *Pseudomonas fulva*, *Klebsiella aerogenes*, *Bordetella pertussis*, *Phaeobacter piscina* e entre outras.

Apesar dos iniciadores e sondas do HHV1 e HHV2 terem especificidade para outras espécies, os locais onde estas bactérias são comumente isoladas são incompatíveis com o local da coleta dos espécimes clínicos indicados neste trabalho. Além disso, o *amplicon* será gerado e detectado somente se ambos os iniciadores e a sonda hibridizarem, o que só será possível para os microrganismos os quais eles são específicos ao mesmo tempo, ou seja somente para HHV1 e HHV2.

Corey (2005) incluiu em sua avaliação inicial da PCR de tipagem de HHV ensaios dos iniciadores e sondas contra altas concentrações de DNA de outros microrganismos, como CMV (Citomegalovírus), EBV (Epstein-Barr vírus), HHV 6 (Herpesvírus humano 6), HHV 8 (Herpesvírus humano 8) e VZV (Varicella-Zoster vírus). Não foi observada reatividade cruzada a nenhum desses vírus segundo Corey (2005). Na validação destes iniciadores pelo Instituto Hermes Pardini, foi realizado testes de reatividade cruzada com o CMV, EBV e VZV, os resultados obtidos foram concordantes com Corey (2005), ou seja, não houve reatividade cruzada.

Tendo em vista que o limite de detecção do HHV 1 e HHV 2 foi previamente estabelecido, sendo de 15,6 cópias de DNA/ $\mu$ L, não foi realizado experimentos para a determinação do LOD de HHV 1 e 2 neste estudo. Neste estudo foram realizados testes para se avaliar uma possível reação cruzada entre as sondas do HHV 1 e HHV 2.

#### 6.4 Desenvolvimento da PCR em Tempo Real *Multiplex*

O controle positivo contendo o DNA individual de HHV 1, HHV 2 ou *T. pallidum* e amostras contendo a mistura do DNA de dois ou mais patógenos foram submetidas ao PCR em tempo real com os iniciadores e sondas desenvolvidos para a detecção individual de HHV 1, HHV 2 ou *T. pallidum*. Estes mesmos controles foram também testados com os iniciadores e sondas desenvolvidos para a detecção simultânea de HHV 1, HHV 2 e *T. pallidum* (Quadro 7, Figuras 8, 9 e 10). Foi observada amplificação do DNA de HHV 1, HHV 2 e *T. pallidum* tanto nas amostras que continham a mistura do DNA de todos os patógenos quanto naquelas amostras que continham o DNA individual de cada um. Não foi observada amplificação inespecífica, quando se usou DNA alvo de um patógeno e sonda e iniciadores específicos para demais patógenos. Foi observada amplificação somente do(s) alvo(s) específico(s). Em todos os testes realizados, não foi observada reatividade cruzada ou inibição dos iniciadores e sondas com as espécies não correspondentes.

**TABELA 5: Reações entre iniciadores, sondas e *template* na PCR *Multiplex* demonstrando o *amplicon* e o valor de CT gerado em cada reação.**

<b>Inciadores e Sondas</b>	<b>DNA (<i>Template</i>) utilizado na reação</b>	<b><i>Amplicon</i> e valor de Ct</b>
<i>T.pallidum</i>	HHV1	-
	HHV 2	-
	HHV 1 + HHV2	-
	HHV 1 + HHV2 + TP	TP (Ct: 30,97)
HHV 1	HHV1	HHV 1 (Ct: 29,76)
	HHV 2	-
	HHV 1 + HHV2	HHV 1 (Ct: 30,23)
	HHV 1 + HHV2 + TP	HHV 1 (Ct: 29,6)
HHV 2	HHV1	-
	HHV 2	HHV 2 (Ct: 28,62)
	HHV 1 + HHV2	HHV 2 (Ct: 29,53)
	HHV 1 + HHV2 + TP	HHV 2 (Ct: 29,13)
<i>T.pallidum</i> HHV 1 HHV 2	HHV1	HHV 1 (Ct: 29,6)
	HHV 2	HHV 2 (Ct: 28,82)
	HHV 1 + HHV2	HHV 1 (Ct: 30,17) + HHV2(Ct: 28,84)
	HHV 1 + HHV2 + TP	HHV 1 (Ct: 30,23) + HHV2(Ct: 28,76) + TP (Ct:31,76)

HHV: Herpesvírus humano; TP: *T. pallidum*;

Concentrações utilizadas: 300 nM para os iniciadores senso e anti-senso e de 100nM para as sondas. Número de cópias de DNA: 162 cópias/ $\mu$ L;

Termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), empregando-se o sistema de detecção por sondas complementares (TaqMan® Thermo Fischer Scientific, Massachusetts, EUA) e TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América);

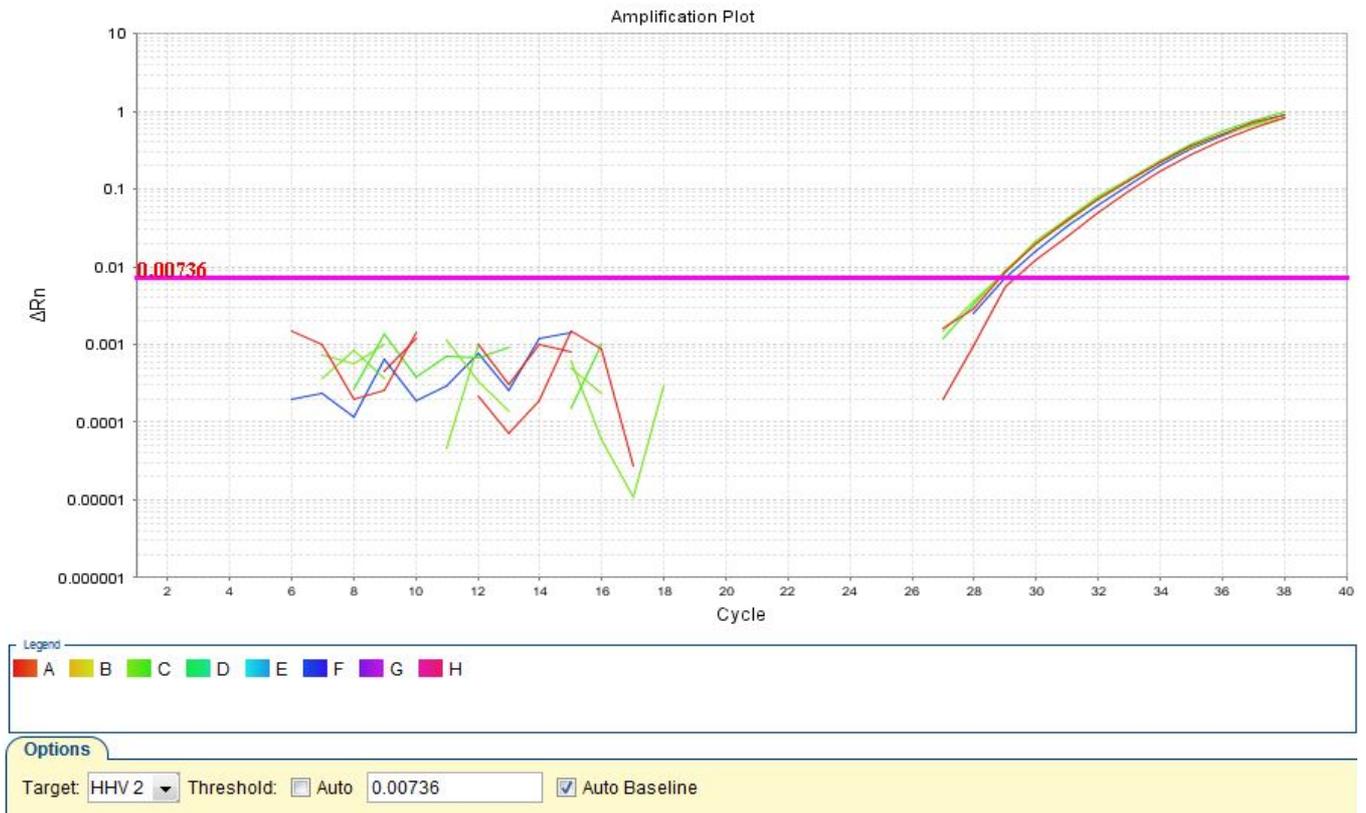
Ciclagem utilizada: incubação a 50°C por 2 minutos, (ii) incubação inicial a 95 °C por 10 minutos, (iii) 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.

Diferentes PCRs em tempo real foram realizadas e seus Cts (Ciclos *threshold*) foram comparados. Para o HHV 1 foram realizadas as reações em *Singleplex*, que apresentou um Ct de 29,76; em *Duplex*, para HHV 1 e HHV 2, O HHV 1 apresentou um Ct de 30,53; e em *Multiplex*, para o HHV 1, HHV 2 e *T.pallidum*, O HHV 1 apresentou um Ct de 30,23 (Figura 8, Quadro 7). Todas estas reações foram realizadas com o controle positivo comercial Vircell, diluído a 162 cópias de DNA/ $\mu$ L.



**Figura 8- Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real do Herpesvírus humano 1.** 162 cópias de DNA/ $\mu$ L utilizado na reação. *Singleplex*: Ct do HHV 1 de 29,76; *Duplex*, para HHV 1 e HHV 2: Ct do HHV 1 de 30,53; *Multiplex*, para o HHV 1, HHV 2 e *T.pallidum*: Ct do HHV 1 de 30,23. Marcação da sonda HHV 1: VIC. Foi utilizado TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América) Referência passiva: Mustang Purple® (Thermo Fisher). Ciclagem utilizada: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.

Para o HHV 2 foram realizadas as reações em *Singleplex*, que apresentou um Ct de 28,82; em *Duplex*, para HHV1 e HHV2, o HHV2 apresentou um Ct de 28,84, e em *Multiplex*, para o HHV1, HHV2 e *T.pallidum*, o HHV2 apresentou um Ct de 28,76 (Figura 9, Tabela 5). Todas estas reações foram realizadas com o controle positivo comercial Vircell, diluído a 162 cópias de DNA/ $\mu$ L.



**Figura 9: Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real do Herpesvírus humano 2.** 162 cópias de DNA/ $\mu$ L utilizado na reação. *Singleplex*: Ct do HHV 2 de 28,82; *Duplex*, para HHV 1 e HHV 2: Ct do HHV 2 de 28,84; *Multiplex*, para o HHV 1, HHV 2 e *T.pallidum*: Ct do HHV 2 de 28,76. Foi utilizado TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América) Marcação da sonda HHV 2: JUN. Referência passiva: Mustang Purple® (Thermo Fisher). Ciclagem utilizada: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.

Para o *T. pallidum* foram realizadas as reações em *Singleplex*, que apresentou um Ct de 30,97 e em *Multiplex*, para o HHV 1, HHV 2 e *T.pallidum*, que apresentou um Ct de 31,76 (Figura 10, Tabela 5). Todas estas reações foram realizadas com o controle positivo comercial Vircell, diluído a 162 cópias de DNA/ $\mu$ L.



**Figura 10: Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real *T.pallidum*.** 162 cópias de DNA/ $\mu$ L utilizado na reação. *Singleplex*: Ct do TP: 30,97; *Multiplex*, para o HHV 1, HHV 2 e *T.pallidum*: Ct do TP de 31,76. Foi utilizado TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América) Marcação da sonda: FAM. Referência passiva: Mustang Purple® (Thermo Fisher). Ciclagem utilizada: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.

Alíquotas contendo o DNA individual de HHV 1 e amostras contendo a mistura do DNA dos demais patógenos, HHV 2 e *T.pallidum*, foram submetidas a PCR em tempo real, conduzidas com os iniciadores e sondas desenvolvidos para a detecção de HHV 1, HHV 2 e *T.pallidum*. Foi observada amplificação do DNA de HHV 1 tanto nas amostras que continham a mistura do DNA dos demais patógenos quanto naquelas amostras que continham o DNA

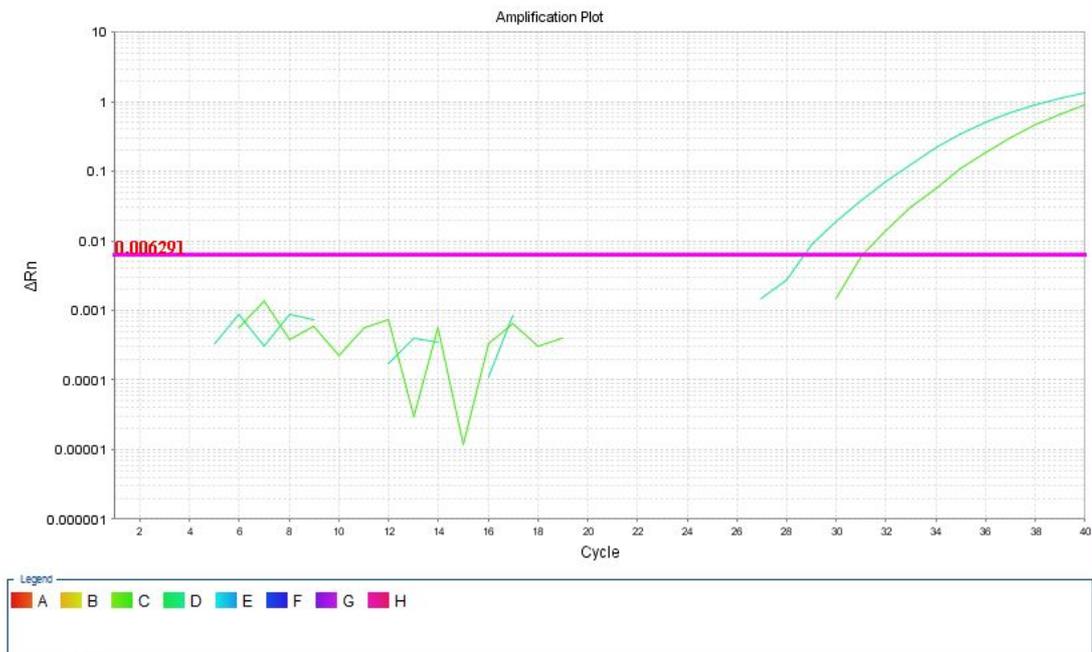
individual de HHV 1. As amostras de DNA de HHV 1 e as amostras com a mistura de DNA apresentaram valores de Ct bastante semelhantes para o *Singleplex*, para o *Duplex*, e para o *Multiplex* dos 3 microrganismos. Estes dados demonstram desta forma que os iniciadores e sondas testados para HHV1 são específicos, não apresentando resultados falso-positivos. Adicionalmente, foi possível observar que não houve inibição da amplificação do alvo devido a presença do DNA dos demais patógenos, e a competição gerada pela presença de múltiplos iniciadores, sondas e DNAs não interferiu na amplificação e detecção do alvo na reação de *Multiplex*. Corroborando desta forma que o *Multiplex* é viável.

Foram realizados estudos de interferência e inibição para HHV2 através de reações com amostras contendo a mistura do DNA dos patógenos em *Singleplex*, em *Duplex*, para HHV1 e HHV2, e *Multiplex*, para HHV1 e HHV2 e *T.pallidum*. Os valores de Cts obtidos foram bastante semelhantes para o *Singleplex*, para o *Duplex* e *Multiplex*, demonstrando a eficiência da reação e a alta sensibilidade dos iniciadores e sondas utilizados em detrimento à presença dos demais DNAs.

Para o *T. pallidum* foram realizadas as reações em *Singleplex* e *Multiplex*, para HHV1 e HHV2 e *T.pallidum*, e houve amplificação do alvo em todas as reações, desta forma pode-se observar que os iniciadores e sondas testados são específicos, não apresentando resultados falso-positivos. Foi possível observar também que não houve inibição da amplificação do alvo devido à presença do DNA dos demais patógenos, e a competição gerada pela presença de múltiplos iniciadores, sondas e DNAs não interferiu na amplificação e detecção do alvo na reação *Multiplex*. Assim, os resultados corroboraram que o PCR em tempo real *Singleplex* e o *Multiplex* são viáveis tecnicamente. Desta maneira, pode-se observar que os iniciadores e sondas testados são eficientes e específicos não apresentando resultados falso-positivos. Infecções múltiplas, causadas por mais de um patógeno devem ser detectadas sem que haja interferência na detecção como inibição devido a presença de múltiplos iniciadores, sondas e DNAs.

## 6.5 Teste de amostras clínicas

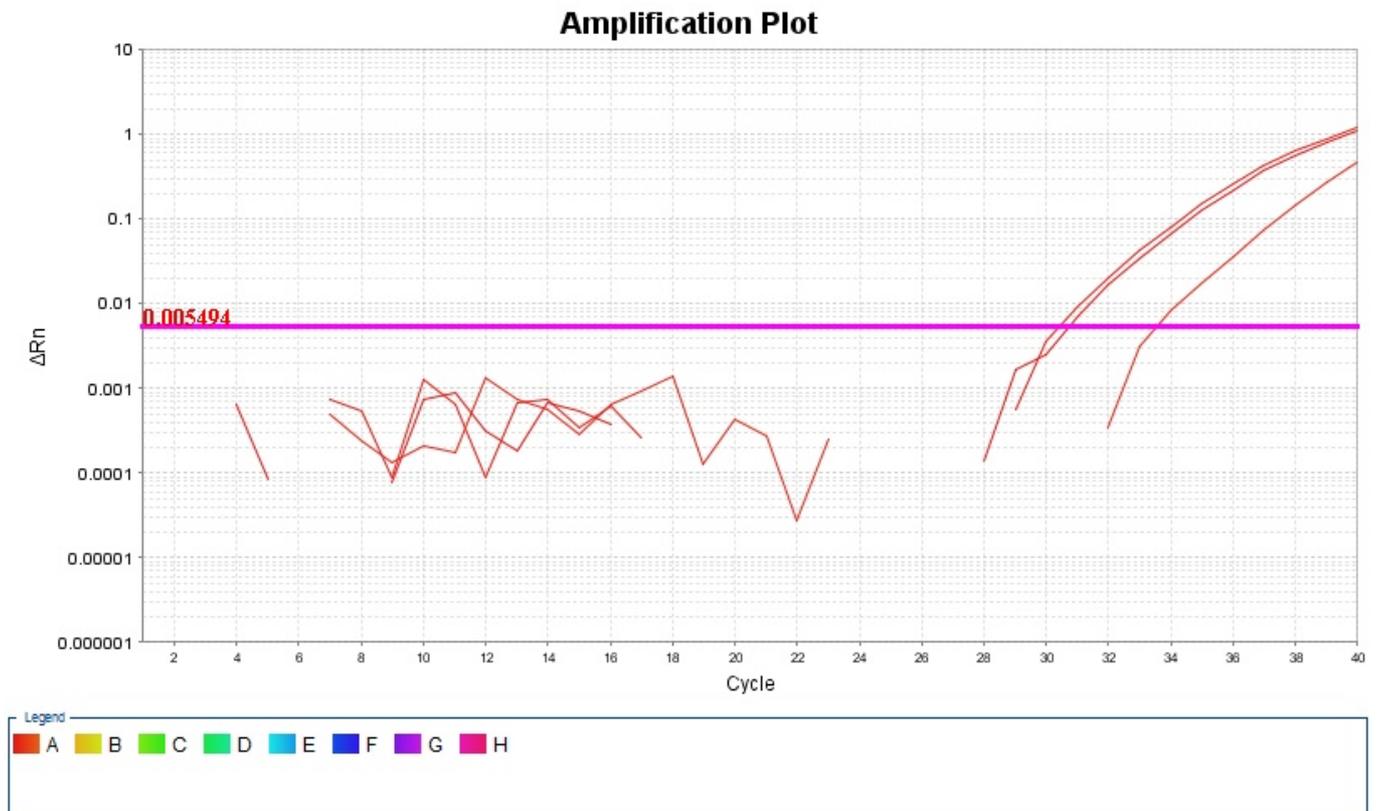
Das 88 amostras com suspeita de patógenos causadores de ISTs, que foram testadas, todas amplificaram o controle interno RNase P. Na reação de *Multiplex*, duas amostras foram positivas para HHV2 e, segundo resultados obtidos da rotina do laboratório, ambas foram negativas para *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Mycoplasma genitalium*; *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Trichomonas vaginalis*. Estas duas amostras foram novamente testadas para HHV2 em reação *Singleplex* e o resultado foi concordante, quando foi observada a amplificação do gene para HHV2. A Amostra 39 amplificou com um Ct de 28,7 (Figura 11) na reação de *Multiplex* e com um Ct 30,73 na reação de *Singleplex* (Figura 11). A Amostra 63 (Figura 11) amplificou com um Ct de 31,15 na reação de *Multiplex* e com um Ct 30,53 na reação de *Singleplex* (Figura 12). Das demais amostras negativas, uma foi positiva para *Neisseria gonorrhoeae*, uma para *Chlamydia trachomatis*, seis para *Ureaplasma urealyticum* e uma para *Mycoplasma homynis*, reforçando desta maneira a especificidade dos iniciadores e sondas do *Multiplex* já que não houve reação cruzada com os microrganismos encontrados nas amostras clínicas testadas.



**Figura 11: Curvas de amplificação das amostras positivas para HHV2 da reação de PCR em tempo real *Multiplex*, para o HHV 1, HHV 2 e *T.pallidum*.**

Amostra 39 (em verde claro) Ct: 28,7. Amostra 63 (em azul) Ct: 31,15. Foi utilizado TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América) Marcação da

sonda: JUN. Referência passiva: Mustang Purple® (Thermo Fisher). Ciclagem utilizada: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.



**Figura 12: Curvas de amplificação das amostras positivas para HHV2 da reação de PCR em tempo real *Singleplex* para o HHV 2.**

Amostra 39 Ct: 30,73. Amostra 63 Ct: 30,53. A terceira curva de amplificação é do controle positivo a 162 cópias de DNA/ $\mu$ L Ct: 33,64. Foi utilizado TaqMan® Multiplex MasterMix (Thermo Fisher, Carlsbad, Estados Unidos da América). Marcação da sonda: JUN. Referência passiva: Mustang Purple® (Thermo Fisher). Ciclagem utilizada: 50°C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C.

Das 88 amostras testadas com suspeitas clínicas de ISTs, duas amostras foram positivas para HHV2 quando submetidas ao teste da PCR *multiplex*. Destas, ambas tiveram um resultado negativo para outras ISTs testadas. O diagnóstico de infecção por HHV2 teria sido um diagnóstico diferencial e de fundamental importância para o tratamento assertivo destes pacientes. O teste *Multiplex* proposto neste trabalho permitirá que os pacientes tenham mais opções diagnósticas para a detecção do agente etiológico.

Inúmeras causas podem ser atribuídas às úlceras genitais como infecções inespecíficas por fungos, vírus ou bactérias (ex.: dermatoses bolhosas, o eritema multiforme e a dermatite de contato; líquen plano erosivo; a as lesões traumáticas; erupção por drogas e até mesmo le-

sões malignas, como o carcinoma) (BRASIL, PCDT, 2015). Vários estudos etiológicos da úlcera genital (ORLE *et al*, 1996; RISBUD *et al*, 1999; SCOTT *et al*, 2010; SUNTOKE *et al*, 2009; LIU *et al*, 2005; MACKAY *et al*, 2006) concordaram que os métodos de detecção baseados na PCR fornecem um diagnóstico mais definitivo do que o diagnóstico clínico e os métodos tradicionais de laboratório.

O herpes genital pode frequentemente ser diagnosticado com base nas características clínicas, principalmente durante o primeiro episódio da infecção. Estas incluem a presença de vesículas e/ou úlceras dolorosas que podem estar presentes em vários locais anatômicos e linfadenopatia inguinal dolorosa. Entretanto, quando a ulceração está presente na ausência de vesiculação, várias outras condições precisam ser consideradas. Deve-se dar uma atenção principal em indivíduos infectados pelo HIV. Além disso, infecções simultâneas com duas ou mais ISTs também podem ocorrer de tempos em tempos. Conseqüentemente, basear o diagnóstico apenas em características clínicas tem sensibilidade e especificidade muito baixas. Todas as úlceras genitais, independentemente da sua aparência, devem ser testadas para HHV (MINDEL, 2011). Portanto, destaca-se a importância de se identificar o agente etiológico.

Esta pesquisa teve como limitação a falta de amostras clínicas oriundas do Centro de Referência URS-Centro Sul da Prefeitura de Belo Horizonte para testar, apesar de ter aprovação ética, não foi possível obter amostras. Apesar de se ter até o momento resultados promissores, deve ser feita a comparação com os testes de rotina realizados na unidade de saúde da Prefeitura de Belo Horizonte, sendo eles: para o *T. pallidum*: pesquisa de *T. pallidum* por microscopia de campo escuro, hemaglutinação, VDRL (quantitativo e qualitativo), e teste rápido para sífilis. E para o HHV: pesquisa de células herpéticas por microscopia de lâmina corada ao Giemsa.

## 8 Perspectivas

Este projeto tem como perspectivas futuras para a PCR *Multiplex* a realização dos testes otimização das concentrações de iniciadores e sondas, testes de precisão e especificidade, além do estabelecimento do LOD. Para a reação *Singleplex* de *T.pallidum* a redução do LOD e testes para a otimização da precisão e eficiência.

Este projeto tem como perspectivas futuras a realização dos testes com as amostras de pacientes com úlceras genitais suspeitas de infecção por *T. pallidum* ou HHV1 ou HHV2, as perspectivas de continuidade dependem agora da autorização do centro de referência no diagnóstico de ISTs, da Prefeitura de Belo Horizonte. Caso esta autorização seja concedida, 100 amostras serão coletadas e avaliadas e comparados os resultados de PCR com resultados de testes feitos na rotina diagnóstica da URS-Centro Sul segundo os seguintes critérios:

*Critérios de inclusão:* Pacientes do sexo feminino ou masculino, com idade acima de 18 anos sexualmente ativos que procurem a unidade de atendimento apresentando lesões ulceradas na região genital ou perianal. Parceiros sexuais de pacientes com lesões aparentes ou que previamente foram diagnosticados com alguma das seguintes ISTs: *T. pallidum* ou HHV1 ou HHV2; Pacientes que aceitem e assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme Apêndice A.

*Critérios de exclusão:* Pacientes em uso de antibiótico(s) sistêmico ou qualquer medicação de uso tópico na região genital, uretral ou perianal, ou que tenham o(s) tenha(m) terminado o uso há menos de 30 dias; Pacientes menores de 18 anos.

Nesta proposta os pacientes serão atendidos segundo a rotina do serviço de saúde, após preenchimento do prontuário do Setor e a anamnese; mediante a explicação do projeto de pesquisa ao paciente e após seu consentimento e assinatura do TCLE, será realizada a coleta das amostras, de acordo com os protocolos de rotina da Instituição. Segundo a rotina do Setor, serão oferecidos os testes sorológicos para sífilis e para o vírus da imunodeficiência humana (HIV). A coleta de dados dos pacientes será realizada pelos profissionais do serviço de saúde, dentro do procedimento de rotina deste. Cada paciente será identificado com um código para que sua identidade e privacidade sejam asseguradas. Conforme Apêndice B FORMULÁRIO DE REGISTRO DE DADOS DA PESQUISA “Desenvolvimento de uma PCR em Tempo Real para a detecção de patógenos causadores de Doenças Sexualmente Transmissíveis.”). O período de tempo estimado para a coleta de dados será de quatro meses. Os materiais para PCR serão armazenados em meio conservante comercial Digene® em free-

zer a -20°C e encaminhados após a coleta para o laboratório de biologia molecular e genética do Instituto Hermes Pardini onde serão processados os testes.

*Estudo comparativo de métodos:* As amostras serão testadas através de um método comparativo válido em paralelo com o novo teste em desenvolvimento. Os resultados dos testes realizados na unidade de saúde da Prefeitura de Belo Horizonte, sendo para o *T. pallidum*: pesquisa de *T. pallidum* por microscopia de campo escuro, hemaglutinação, VDRL (quantitativo e qualitativo), e teste rápido para sífilis. Para *H. ducreyi*: microscopia de lâmina corada ao Gram. E para o HHV: pesquisa de células herpéticas por microscopia de lâmina corada ao Giemsa. Todos os resultados dos testes citados serão comparados com os resultados obtidos do PCR em Tempo Real que está sendo proposto no presente trabalho. Em adição, serão comparados os resultados obtidos através do PCR em Tempo Real, com os resultados do teste rápido para HIV e CD4 disponibilizado aos pacientes. Desta maneira poderá ser feita uma possível correlação entre a taxa de infecção de ISTs entre pacientes HIV soronegativos e pacientes HIV soropositivos, portadores de úlceras genitais.

## Referências

ALTMAN S. Ribonuclease P. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.366, n.1580, p.2936–2941, 2011

ADEGOKE AO, AKANNI OE. Survival of *T. pallidum* in banked blood for prevention of Syphilis transmission. **North American Journal of Medical Science**, v.3, n.7, p.329-332, 2011.

AutoDimer: a screening tool for iniciador-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**. 2004 v.37, n.2, p.226-31 Disponível em: >[www.cstl.nist.gov/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm](http://www.cstl.nist.gov/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm)< Acesso em: 16 de setembro de 2016

AVELLEIRA JCR, BOTTINO G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. **An. Bras.Dermatol.** v.81, n.2, p.111-126. 2006

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** v.215 p. 403-410 -Disponível em: > <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>< Acesso em: 04 de maio de 2017, 1990

BLAST, NCBI. Disponível em: ><https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> CMD=Web&PAGE\_TYPE=BlastDocs&DOC\_TYPE=FAQ#expect<Acesso em: 28 de março de 2018

BLOOM D, MAHAL A, SEVILLA J, Commission on Macroeconomics and Health Working Paper Series, **River Path Associates: AIDS & economics**, 2001.

BONG CTH, BAUER ME, SPINOLA SM. *Haemophilus ducreyi*: clinical features, epidemiology, and prospects for disease control. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 11, p.1141–1148 Elsevier, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais. **Manual técnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais. **Manual técnico para o diagnóstico da sífilis**. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de IST, Aids e Hepatites Virais. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (PCDT)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. Compra e distribuição de medicamentos e insumos de prevenção **Departamento de IST, aids e hepatites virais: portal sobre aids, infecções sexualmente transmissíveis e hepatites virais**. Disponível em: ><http://www.aids.gov.br/pagina/compra-e-distribuicao-de-medicamentos-e-insumos-de-prevencao><Acesso em: 2 de março de 2017, 2017

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Clinical Protocol and Therapeutic Guidelines for Prevention of Vertical Transmission of HIV, Syphilis and Viral Hepatitis**, 2017a

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. **Sífilis: Estratégias para Diagnóstico no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. 100 p. (Série TELELAB), 2010

BRASIL, Ministério da Saúde, **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, volume 48. Disponível em: ><http://www.aids.gov.br/noticia/2016/ministerio-da-saude-lancaacao-nacional-de-combate-sifilis>< Acesso em: 18 de fevereiro de 2017, 2016

BRASIL, Ministério da Saúde, **Boletim Epidemiológico**. Brasília: Ministério da Saúde, Disponível em: > <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/13/BE-2017-038-Boletim-Sifilis-11-2017-publicacao-.pdf>< Acesso em: 17 de outubro de 2018, 2017

BRASIL, Ministério da Saúde, **Boletim Epidemiológico - Aids e ISTA** Ano II - nº 1 - até semana epidemiológica 26ª - dezembro de 2013. Brasília: Ministério da Saúde, 2013

BRASIL, Ministério da Saúde, **Boletim Epidemiológico - Aids e ISTA** Ano IV - nº 1 - da 27ª à 53ª semana epidemiológica - julho a dezembro de 2014, Ano IV - nº 1 - da 01ª à 26ª semana epidemiológica - janeiro a junho de 2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2015a

BRASIL, Ministério da Saúde, **Boletim Epidemiológico**. Secretaria de vigilância em saúde, 1969-2016. Anual. Volume 47 N° 35. ISSN 2358-9450. Brasília: Ministério da Saúde, 2016

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**. Nota informativa conjunta nº 109/2015: Orienta a respeito da priorização da penicilina G benzatina para sífilis em gestantes e penicilina cristalina para sífilis congênita no país e alternativas para o tratamento da sífilis. Brasília, 2015a

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos**. Relatório de recomendação (CONITEC): Penicilina benzatina para prevenção da sífilis congênita durante a gravidez. Brasília, 2015b

BRUISTEN SM, CAIRO I, FENNEMA H, PIJL A, BUIMER M, PEERBOOMS PGH, VAN DYCK E, MEIJER A, OSSEWAARDE JM, VAN DOORNUM GJJ, Diagnosing Genital Ulcer Disease in a Clinic for Sexually Transmitted Diseases in Amsterdam, The Netherlands, **J. Clin. Microbiol.** v. 39, n. 2, p. 601-605, 2001

BURD EM, Validation of Laboratory-Developed Molecular Assays for Infectious Diseases, **Clinical Microbiology Reviews**, v.23 n.3, p. 550-576, 2010

BUSTIN AS, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J, WITWER CT. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR experiments, **Clinical Chemistry**, v. 55 n.4, p. 611-622, 2009

CAMERON CE, LUKEHART SA, Current Status of Syphilis Vaccine Development: Need, Challenges, Prospects. **Vaccine**, v.32, n.14, p.1602-1609, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) Division of Sexually Transmitted Disease Prevention partnered with the Association of Public Health Laboratories (APHL), Consultation on Laboratory Diagnosis of Syphilis Meeting Report, Atlanta, GA, United States, 2018. Disponível em: <<https://www.aphl.org/aboutAPHL/publications/Documents/ID-2018Aug-Syphilis-Meeting-Report.pdf>>. Acesso em: 17 de outubro de 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually Transmitted Diseases, Treatment Guidelines, 2015. Atlanta: CDC, 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/tg2015/>>. Acesso em: 20 agosto 2015.

CDC - Susan Lindsley Disponível em: > <http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/syphilis32.html> ≤ Acesso em: 11 de maio de 2017

CDC - Dr. Gavin Hart; Dr. N. J. Fiumara Disponível em: ><http://hardinmd.lib.uiowa.edu/cdc/syphilis36.html> ≤ Acesso em: 11 de maio de 2017

CHAYAVICHITSILP P, BUCKWALTER JV, KRAKOWSKI AC, FRIEDLANDER SF, Herpes simplex. **Pediatrics in review**, American Academy of Pediatrics, Northwest Point Blvd., v.30, n.4 p.119–29, 2009.

CHEN CY, KAI-HUA C, ROBERT WG, DAVID LC, AMITABH S, SILVA MR, CARNEIRO F, GREGORY Y, LAUWERS, BALLARD RC, Diagnosis of gastric syphilis by direct immunofluorescence staining and real-time PCR testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n.9, p. 3452-3456, 2006

CHEN CY, BALLARD RC, BECK-SAGUE CM, DANGOR Y, RADEBE F, SCHMID S, WEISS JB, TSHABALALA V, FEHLER G, HTUN Y, MORSE SA. Human immunodeficiency virus infection and genital ulcer disease in South Africa: the herpetic connection. **Sex.-Transm. Dis.** v.27 p.21–29. 2000

CHEN CY, BALLARD RC. The Molecular Diagnosis of Sexually Transmitted Genital Ulcer Disease. *Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, DOI 10.1007/978-1-61779-937-2\_6, Springer Science+Business Media New York, vol. 903, 2012

Committee on Infectious Diseases. HPV vaccine recommendations. **Pediatrics**, v.129, p. 602–605. 2012

COREY L, ADAMS H, BROWN ZA, HOLMES K. Genital herpes simplex virus infections: clinical manifestations, course and complications. **Ann Intern Med**; v. 98 p.958–72, 1983

COREY L. The diagnosis and treatment of genital herpes. **JAMA**; v.248 p.1041–49, 1982.

COREY L, HUANG M, SELKE S, WALD A. Differentiation of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 in Clinical Samples by a Real-Time Taqman PCR Assay. **Journal of Medical Virology** v.76, p.350–355, 2005

CORONA R, F. CAPRILLI ME, TOSTI G, GENTILI A, GIGLIO G, PRIGNANO P, PASQUINI, MELE A. Risk of human immunodeficiency virus infection and genital ulcer disease among persons attending a sexually transmitted disease clinic in Italy. **Epidemiol. Infect.** v.121 p.623–630,1998.

DYER JR, ERON JJ, HOFFMAN IF, KAZEMBE P, VERNAZZA PL, NKATA E, COSTELLO DC, FISCUS SA, COHEN MS. Association of CD4 cell depletion and elevated blood and seminal plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA concentrations with genital ulcer disease in HIV-1-infected men in Malawi. **J. Infect. Dis.** v.177, p.224–227, 1998

EMILY T, MARTIN MPH, KRANTZ E, GOTTLIEB SL, MAGARET AS, LANGENBERG PA, STANBERRY L, KAMB M, WALD A. A Pooled Analysis of the Effect of Condoms in Preventing HSV-2 Acquisition , **Arch Intern Med.** 13; v.169, n,13, p.1233–1240, 2009

JOHNSTON C, KOELLE DM, WALD A. HSV-2: in pursuit of a vaccine ,**J Clin Invest.** v. 121, n.12, p.4600-4609, 2011

FIELDSTEEL AH, COX DL, MOECKLI RA. Cultivation of Virulent *Treponema pallidum* in Tissue Culture. **Infection and Immunity.** v.32, n.2, p.908-915, 1981

FILHO HMT, LEITE CCF. Infecções Sexualmente Transmissíveis: diagnóstico laboratorial. **JBM**, Infectologia, v. 103, n.1, p. 17. 2015

FREDRICKSON JK, BALKWILL DL, ROMINE MF, SHI T, Ecology, physiology, and phylogeny of deep subsurface Sphingomonas sp, **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** v. 23, p.273–283, 1999

FREEMAN EE, WEISS HA, GLYNN JR, CROSS PL, WHITWORTH JA, HAYES RJ. Herpes simplex virus 2 infection, increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. **AIDS.**v.20 n.1, p.73–83. 2006

GADKARI DA, QUINN TC, GANGAKHEDKAR RR, MEHENDALE SM, DIVEKAR AD, RISBUD AR, CHAN-TACK K, SHEPHERD M, GAYDOS C, BOLLINGER RC. HIV-1 DNA shedding in genital ulcers and its associated risk factors in Pune, India. **J.Acquir. Immune Defic.Syindr. Hum. Retrovirol.**v. 18p.277–281, 1998.

GAYET-AGERON A, NINET B, TOUTOUS-TRELLU L,LAUTENSCHLAGER S, FURRER H, PIGUET V, JSCHRENZEL J, HIRSCHHEL B. Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples. **Sexually Transmitted Infections**, v. 85, n. 4, p. 264-269, 2009

GAYET-AGERON A, COMBESCUREA C, LAUTENSCHLAGERB S, NINETC B,PERNEGERA TV. Comparison of diagnostic accuracyof PCR targeting the 47-kilodalton protein

membrane gene of *Treponema pallidum* and PCR targeting the DNA polymerase I gene: Systematic review and Meta-analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 3522-3529, 2015

GEWIRTZMAN A, BOBRICK L, CONNER K, STEPHEN KT, Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, ISBN 978-3-642-14663-3, DOI 10.1007/978-3-642-14663-3\_2, 2011.

GHANEM KG, TUDDENHAM S, MARRAZZO J, BLOOM A. Screening for sexually transmitted infections. ><https://www.uptodate.com/contents/screening-for-sexually-transmitted-infections#H10700351> <Acessado em setembro 2018

GILL AR, RAVANFAR P, MENDOZA N, TYRING SK, Sexual Behavior and Psychological Aspects Associated with Sexually Transmitted Infections, em G. Gross and S.K. Tying (eds.), Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases, p.217-261 DOI: 10.1007/978-3-642-14663-3\_21, © **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2011

Glatz M, Juricevic N, Altwegg M, Bruisten S, Komericki P, Lautenschlager S, Weber R, Bosshard P. P, A multicenter prospective trial to assess a new real-time polymerase chain reaction for detection of *Treponema pallidum*, herpes simplex-1/2 and *Haemophilus ducreyi* in genital, anal and oropharyngeal ulcers, **Clinical Microbiology and Infection a2014 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.20, p. O1020–O1027, 2014

Global data from UNAIDS, AIDS by the Numbers, Nov. 2016. ><https://www.aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101/global-statistics/><. Acessado em julho 2017.

Global data from UNAIDS, AIDS by the Numbers, Nov. 2016. <http://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet><Acessado em julho 2017.

GOERING RV, DOCKRELL H, ZUCKERMAN M, ROITT I, CHIODINI P. Mims' Medical Microbiology, 5th edn. Philadelphia: **Elsevier Saunders**, 2013

GONZÁLEZ-BEIRAS C, MARKS M, CHENG YC, SALLYR, ORIOL M, Epidemiology of *Haemophilus ducreyi* Infections, **Emerging Infectious Diseases** ,v. 22, n. 1, 2016

GRAY RH, WAWER MJ, BROOKMEYER R, SEWANKAMBO NK, SERWADDA D, WABWIRE-MANGEN F et al.; Rakai Project Team. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1 discordant couples in Rakai, Uganda, **Lancet.**; v.357, n.9263, p.1149–53, 2001

GURICH N, GONZALES JE, Role of Quorum Sensing in Sinorhizobium meliloti-Alfalfa Symbiosis, **J. Bacteriol**, v. 191, n.13, p.4372-4382, 2009

HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. Quantitative Real Time PCR. **Genome Res** v. 6, p.986-994,1996

HORVÁTH, A. Biology and natural history of syphilis. **Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases**. Springer Berlin Heidelberg, p. 129-141, 2011.

HOBBS MM, SAN MATEO LR, ORNDORFF PE, ALMOND G, KAWULA TH. Swine model of *Haemophilus ducreyi* infection. **Infection and Immunity**, v. 63, n.8, p.3094-3100, 1995.

JANIER M, HEGYI V, DUPIN N, UNEMO, M, TIPLICA GS, POTOČNIK M, FRENCH P, PATEL R. European guideline on the management of syphilis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v.28, p.1581-1593, 2014.

JENKIN H. Cultivation of treponemes. **Pathogenesis and Immunology of Treponemal Infection**. Dekker, New York, 1982.

JEPSEN OB, HOUGEN KH, BIKCH-ANDERSEN A. Electron microscopy of *Treponema pallidum nichols*. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 74, n. 2, p.241-258, 1968.

KARAMITROS T, HARRISON I, PIORKOWSKA R, KATZOURAKIS A, MAGIORKINIS G, MBISA JL De Novo Assembly of Human Herpes Virus Type 1 (HHV-1) Genome, Mining of Non-Canonical Structures and Detection of Novel Drug-Resistance Mutations Using Short- and Long-Read Next Generation Sequencing Technologies. **PLoS ONE** v.11, n.6, 2016

KIELAK AM, BARRETO CC, KOWALCHUK GA, VAN VEEN JA, KURAMAE EE, The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.744, 2016

LAGERGARD T. *Haemophilus ducreyi*: pathogenesis and protective immunity, **Trends Microbiol** v.3, p. 87–92, 1995

LEE JY, NA YA, KIM E, LEE HS, KIM. The *Actinobacterium Corynebacterium glutamicum*, an Industrial Workhorse. **J. Microbiol. Biotechnol**, v.26, n.5, p.807–822, 2016

LEWIS DA. Chancroid: clinical manifestations, diagnosis, and management ,**Sexually Transmitted Infection**, v. 79, p. 68–71, 2003.

LI-GUAN LI, LIN C, TONG Z, Genome of Cupriavidus sp. HMR-1, a Heavy Metal-Resistant Bacterium. **Genome Announc.** v. 1, n.1, 2013

LINGAPPA JR, BAETEN JM, WALD A, HUGHES JP, THOMAS KK, MUJUGIRA A *et al.*; Partners in Prevention HSV/HIV Transmission Study Team. Daily acyclovir for HIV-1 disease progression in people dually infected with HIV-1 and herpes simplex virus type2: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet** v. 375, n. 9717, p.824–33, 2010

LITHGOW KV, HOF R, WETHERELL C, PHILLIPS D, HOUSTON S, CAMERON CE. A defined syphilis vaccine candidate inhibits dissemination of *Treponema pallidum subspecies pallidum*. **Nature Communications**, v.8, publication 14273, 2017.

LIU AY, JIANG MJ, YIN YP, SUN JF. Detection of pathogens causing genital ulcer disease by multiplex polymerase chain reaction. **Chinese Med Sci J** v.20, p.273–275, 2005

LIU H, RODES B, CHEN CY, STEINER B, New tests for syphilis : rational design of a PCR method for detection for *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gen **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.5, p. 1941-1946, 2001

LOOKER KJ, MAGARET AS, MAY MT, TURNER KME, VICKERMAN P, et al. Global and Regional Estimates of Prevalent and Incident Herpes Simplex Virus Type 1 Infections in 2012. **PLOS ONE** v.10, n.10, e0140765, 2015

LOOKER KJ, MAGARET AS, TURNER KME, VICKERMAN P, GOTTLIEB SL, NEWMAN LM. First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection- **The Lancet Global Health** , v. 5, n.3 , e300 - e309, 2017

LUU M, HAM C, KAMB ML, CAFFE S, HOOVER KW, PEREZ F. Syphilis testing in antenatal care: Policies and practices among laboratories in the Americas, **Int J Gynecol Obstet**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.04.011>, 2015

MERTZ GJ, BENEDETT J, ASHLEY R, SELKE S, COREY L. Risk factors for the sexual transmission of genital herpes. **Ann Intern Med**; v.16 p.197–202, 1992

MEYER T, Novel Diagnostic Methods, em G. Gross and S.K. Tying (eds.), Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases, p.749-773, DOI: 10.1007/978-3-642-14663-3\_21, **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2011

MINDEL A, Genital herpes, em G. Gross and S.K. Tying (eds.), Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases, p.217-261 DOI: 10.1007/978-3-642-14663-3\_21, © **Springer-Verlag Berlin Heidelberg**, 2011

MITCHELL P, GERMER J, YAO J. Laboratory Design and Operations, In PERSING D, TENOVER F, TANG Y, NOLTE F, HAYDEN R, VAN BELKUM A, Molecular Microbiology. **ASM Press**, Washington DC, p .127-414, 2011

MMWR - Morbidity and Mortality Weekly Report , Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015, Center for Surveillance, Epidemiology, and Laboratory Services, **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)**, U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, v.64, n. 3, 2015

National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, 2016< <https://www.cdc.gov/condomeffectiveness/index.html>< Acessado em janeiro de 2017

NEWMAN L, KAMB M, HAWKES S, GOMEZ G, SAY L, SEUC A, et al. Global Estimates of Syphilis in Pregnancy and Associated Adverse Outcomes: Analysis of Multinational Antenatal Surveillance Data, **PLoS Med** v.10, n.2, e1001396. doi:10.1371/journal.pmed.1001396, 2013

NØRSKOV-LAURITSEN. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter species* with host specificity for humans . **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 214–240, 2014.

OEPP/EPPO, European and Mediterranean Plant Protection Organization, Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes, Bulletin 36, p.135–144, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections**, Geneva: WHO, Disponível em: >[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75181/1/9789241503839_eng.pdf)< acessado em 5 de agosto de 2016, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global strategy for the prevention and control of sexually transmitted infections: 2006 - 2015 breaking the chain of transmission , Geneva: WHO, ISBN 978 92 4 156347 5, 2007

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Sexually transmitted infections (STIs) fact sheet updated.** Geneva: WHO, Disponível em: > <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>< acessado em 2 de janeiro de 2017, 2016 a

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines for the treatment of *Treponema pallidum* (syphilis).** Geneva: WHO, Disponível em: > <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>< acessado em 2 de março de 2017, 2016 b

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global health sector strategy on sexually transmitted infections, 2016–2021.** Geneva: WHO, Disponível em: ><http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246296/1/WHO-RHR-16.09-eng.pdf?ua=1><acessado em 2 de agosto de 2017, 2016 c.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **WHO guidelines for the treatment of genital herpes simplex virus,** Geneva: WHO, 2016d.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates.** Geneva: WHO. Disponível em: >[http://www.who.int/hiv/pub/sti/who\\_hiv\\_aids\\_2001.02.pdf](http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf)< Acesso em: 2 de março de 2017, 2001

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE em 2013 sob o título Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus- Diagnóstico laboratorial de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana / Coordenação de Laboratório do Departamento de IST, AIDS e Hepatites Virais, 2014

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **First global estimates of annual number of neonatal herpes cases.** Geneva: WHO, 2016 a. Disponível em: >[http://who.int/reproductivehealth/topics/maternal\\_perinatal/estimates-neonatal-herpes-cases/en/](http://who.int/reproductivehealth/topics/maternal_perinatal/estimates-neonatal-herpes-cases/en/)<Acesso em: 23 de julho de 2017

ORLE KA, GATES CA, MARTIN DH, BODY BA, WEISS JB, Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus type 1 and 2 from

genital ulcers. **J Clin Microbiol** v.34, p. 49–54, 1996

OWEN W, EISEN JA, HEIDELBERG JF, HICKEY EK, PETERSON JD, DODSON RJ, HAFT DH, GWINN ML, NELSON WC, RICHARDSON DL, MOFFAT KS, QIN H, JIANG L, PAMPHILE W, CROSBY M, SHEN M, VAMATHEVAN JJ, LAM P, McDONALD L, UTTERBACK T, ZALEWSKI C, MAKAROVA KS, ARAVIND L, DALY MJ, MINTON KW, FLEISCHMANN RD, KETCHUM KA, NELSON KE, SALZBERG S, SMITH HO, VENTER JC, FRASER CM. Genome Sequence of the Radioresistant Bacterium *Deinococcus radiodurans* R, **Science** v.286, p.1571, 1999.

OAPS - Observatório de Análise Política em Saúde, Desabastecimento da penicilina e impactos para a saúde da população. Disponível em: ><https://analisepoliticaemsaude.org/oaps/documentos/pensamentos/desabastecimento-da-penicilina-e-impactos-para-a-saude-da-populacao/>< Acesso em: 17 de outubro de 2018, 2017.

OPAS/OMS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Crescente resistência aos antibióticos obriga alterações no tratamento recomendado para infecções sexualmente transmissíveis. Disponível em: >[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5209:crescente-resistencia-aos-antibioticos-obriga-alteracoes-no-tratamento-recomendado-para-infeccoes-sexualmente-transmissiveis&Itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5209:crescente-resistencia-aos-antibioticos-obriga-alteracoes-no-tratamento-recomendado-para-infeccoes-sexualmente-transmissiveis&Itemid=812)< Acesso em: 17 de outubro de 2018, 2016.

PINTO JM, GONÇALVES MPPN. Doenças sexualmente transmissíveis. In: ROCHA, MOC. e col. **Fundamentos em infectologia**. Rio de Janeiro: Rubio, p. 501-515, 2009.

RABENAU HF, KESSLER HH, KORTENBUSCH M, STEINHORST A, RAGGAM RB, BERGER A. Verification and Validation of Diagnostic Laboratory Tests in Clinical Virology. **Journal of Clinical Virology**, v.40, p. 93-98, 2007

RISBUD A, CHAN-TACK K, GADKARI D, GANGAKHEDKAR RR, SHEPHERD ME, BOLLINGER R, MEHENDALE S, GAYDOS C, DIVEKAR A, ROMPALO A, QUINN TC. The Etiology of Genital Ulcer Disease by Multiplex Polymerase Chain Reaction and Re-

lationship to HIV Infection Among Patients Attending Sexually Transmitted Disease Clinics in Pune, India. **Sexually Transmitted Diseases**, v.26, n.1, p. 55–62, 1999.

ROWLINSON MC, BRUCKNER DA, HINNEBUSCH C, NIELSEN K, DEVILLE JG, Clearance of Cellulosimicrobium cellulans Bacteremia in a Child without Central Venous Catheter Removal, **J. Clin. Microbiol.** v. 44, n.7 p. 2650-2654, 2006

ROIZMAN B, KNIPE DM, WHITLEY RJ. Fields virology 6th ed., **LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, a WOLTERS KLUWER business**, Philadelphia, PA USA, 2013

SCHLEISS MR, Vertically transmitted herpesvirus infections. **Herpes: the journal of the IHMF**, v. 10, n. 1, p. 4-11, 2003.

SCHULLER M, JAMES G, THEO PS, GREGORY SJ, CATRIONA LH, IAN WJC, PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective, **Springer Science+Business Media**, 2010

SCOULAR A, GILLESPIE G, CARMAN WF. Polymerase chain reaction for diagnosis of genital herpes in a genitourinary medicine clinic. **Sexually Transmitted Infections**, v.78, p. 21-25, 2002

SCOTT LJ, GUNSON RN, CARMAN WF, WINTER AJ. A new multiplex real-time PCR test for HSV1/2 and syphilis: an evaluation of its impact in the laboratory and clinical setting. **Sex Transm Infect** v.86, p.537–539, 2010

SIMARD EP, PFEIFFER RM, ENGELS EA. Cumulative incidence of cancer among individuals with acquired immunodeficiency syndrome in the United States. **Cancer**, v.117, p. 1089–1096, 2011.

SLOAN ML, Real-Time PCR in Clinical Microbiology : Verification, Validation and Contamination Control. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.29, n.12, p.87-95, 2005

STEEN R. Eradicating chancroid. **Bull World Health Organ.** v.79 p.818–26, 2001

SUNTOKE TR, HARDICK A, TOBIAN AAR, MPOZA B, LAEYENDECKER O, SERWADDA D, OPENDI P, GAYDOS CA, GRAY RH, WAWER MJ, QUINN TC, REYNOLDS SJ. Evaluation of multiplex real-time PCR for detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, herpes simplex virus type 1 and 2 in the diagnosis of genital ulcer disease in the Rakai District, Uganda. **Sex Transm Infect** v.85, p.97–101, 2009

TOTTEN PA, MORTON WR, KNITTER GH, CLARK AM, KIVIAT NB, STAMM WEA. Primate model for chancroid. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 169, n. 6, p.1284-1290, 1994.

THERMO SCIENTIFIC. TaqMan multiplex real-time PCR. **Product bulletin**. Disponível em: ><https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1600-PJT1731-COL12035-TaqManMultiplex-qPCR-ProdBulletin-Global-FHR.pdf>< Acesso em 18 de Agosto de 2017

[http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_076529.pdf](http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_076529.pdf)

TREES DL, MORSE SA. Chancroid and *Haemophilus ducreyi*: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 3, p. 357-375, 1995.

VALLONE P, BUTLER JM, AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. **Biotechniques**, v.37, p. 226-231, 2004

VICĂ ML, MATEI HV, SISERMAN CV, The Advantages of Using Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of Six Sexually Transmitted Diseases. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology "Polymerase Chain Reaction for Biomedical Applications"**, Chapter 6, ISBN 978-953-51-2796-3

WALD A, ZEH J, SELKE S, ASHLEY RL, COREY L. Virologic characteristics of subclinical and symptomatic genital herpes infections. **N Engl J Med**; v. 333 p.770–75, 1995.

WELLINGS K, COLLUMBIEN M, SLAYMAKER E, et al.: Sexual behaviour in context: a global perspective. **Lancet** v.368 (9548), p.1706–1728, 2006.

WHITLEY RJ, ROIZMAN B. Herpes simplex virus infections, **THE LANCET**, v. 357 p. 1513–18, 2001

## APÊNDICE A – TCLE

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “**Desenvolvimento de um método diagnóstico *in house* para a detecção dos principais patógenos causadores de úlceras genitais**”. Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano do tipo **secreção vaginal ou uretral**. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar, a sua amostra poderá ser usada em outros projetos de pesquisa futuros. Nesta pesquisa pretendemos desenvolver um teste para ser usado no diagnóstico de pacientes com **Infecções Sexualmente Transmissíveis**. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: usaremos a amostra biológica para obtenção de DNA da bactéria ou vírus que esteja causando a doença sexualmente transmissível e em seguida faremos o teste com este DNA. A sua amostra será coletada e guardada em freezer -20oC. Ao fim do estudo, suas amostras serão devidamente descartadas, após serem esterelizadas. Esta pesquisa apresenta riscos mínimos para a sua saúde e são apenas aqueles relacionados à coleta e material da rotina realizada na Unidade de Referência Secundária (URS) Centro-Sul para o diagnóstico de sua doença. A coleta será feita pela equipe qualificada da URS Centro-Sul utilizando materiais de coleta descartáveis e de boa qualidade. Durante a coleta, ocasionalmente, poderão ocorrer pequenos sangramentos na região genital, dependendo do aspecto das possíveis lesões na genitália característicos de determinadas ISTs. Nesses casos serão tomadas as devidas providências para a parada do sangramento, acompanhamento clínico e orientação.

Serão coletados alguns dados de seu prontuário médico, tais como: há quantos dias a lesão está aparente; se o(a) paciente é portador do vírus HIV; se apresentou lesões bolhosas anteriormente; se possui histórico de ISTs. Os resultados dos exames oferecidos pela URS serão consultados, tais como: Identificação presuntiva (microscopia) para: pesquisa de células herpéticas; pesquisa de *H.ducreyi*; Pesquisa de *T.pallidum*; Resultado do exame VDRL; Resultado do exame de HIV.

A pesquisa contribuirá para **o diagnóstico mais rápido e preciso dessas doenças, para o aumento da qualidade de vida e da saúde reprodutiva e infantil e contribuirá para o tratamento dos pacientes**, por isso a sua participação é muito importante,mas você não é obrigado a participar da pesquisa. Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr. (a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pela equipe da **na Unidade de Referência Secundária (URS) Centro-Sul** ou pelos pelo pesquisador deste estudo, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome nunca será divulgado e o seu material biológico só será usado com sua permissão O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no "**Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais**", e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos (**ou até 10 (dez) anos**) na sala 258, bloco F4 do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções No 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa "**Desenvolvimento de um método diagnóstico *in house* para a detecção dos principais patógenos causadores de úlceras genitais**", de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

( ) Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

( ) Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

*Rubrica do pesquisador:* \_\_\_\_\_ *Rubrica do participante:* \_\_\_\_\_

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

---

Nome completo do participante

Data

---

**Nome completo do Pesquisador Responsável: Betânia Paiva Drumond**

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG Telefones:

(31) 34092733

E-mail: betaniadrumond@ufmg.br

Assinatura do pesquisador responsável

**Nome completo do Pesquisador: Vanessa Wolf**

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha CEP: 31270-901 / Belo Horizonte – MG Telefones:

(31) 34092733

E-mail: vanessa.wolf@hermespardini.com.br

Data

Assinatura do participante

---



---

Assinatura do pesquisador (mestrando ou doutorando)

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

**COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG**

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2o andar - Sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901. E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 34094592.

**CES/SMSA/PBH - Centro de Educação em Saúde- Secretaria Municipal de Saúde- Prefeitura de Belo Horizonte.**

Rua Frederico Bracher Júnior, 103, 3o andar, Sala 305 -

Bairro Padre Eustáquio Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP 30.720.000

E-mail:coep@pbh.gov.br Tel.: 3277 - 8508/8516

**APÊNDICE B – FORMULÁRIO DE REGISTRO DE DADOS DA PESQUISA “Desenvolvimento de uma PCR em Tempo Real para a detecção de patógenos causadores de Infecções Sexualmente Transmissíveis.”**

DADOS DO PACIENTE:

Número do prontuário na unidade de saúde:

1. Sexo: ( ) Masculino ( ) Feminino

2. Idade: anos

Há quantos dias a lesão está aparente:

Paciente é soropositivo para HIV:

Apresentou lesões ou vesículas bolhosas anteriormente: Possui histórico de IST:

RESULTADOS:

Os resultados dos exames para as ISTs oferecidos no referido local da coleta.

Data da coleta:

Identificação presuntiva (microscopia):

1. Pesquisa de células herpéticas:

2. *H.ducreyi*:

3. Pesquisa de *T.pallidum*:

Resultado VDRL:

Resultado HIV:

Observações:

Data de preenchimento:

**ANEXO A – PESQUISA DE MERCADO DIAGNÓSTICO DE ISTs**

LABORATÓRIO	MO	MÉTODO/MATERIAL		OUTRAS DSTs			
SABIN	<i>Treponema Pallidum</i> (TP)	VDRL - Quimioluminescência		Mycoplasma hominis Cultura	SECRECAO URETRAL, VAGINAL, endocervical, URINA,		
		IGM - Imunofluorescência Indireta		Cultura, identificação e teste de sensibilidade em kit Mycoplasma IST 2	Esperma, secreção genital		
		Imunofluorescência Indireta	Liquor	Mycoplasma genitalium -PCR	(PCR) MULTIPLEX COM ELETROFORESE - CAPILAR (Metodologia in house)		
		PCR	Liquor	Ureaplasma e Mycoplasma PCR	Urina 1 jato, secreção genital,		
				UREAPLASMA - CULTURA	Cultura, identificação e teste de sensibilidade em kit Mycoplasma IST 2		
				Ureaplasma PCR	Diversos		
				Chlamydia e Neisseria Qualitativo PCR	Urina 1 jato e diversos - PCR em tempo real ( Cobas 4800 - Roche)		
	<i>Haemophilus Ductus</i>	Microscopia- GRAM		Neisseria PCR	Urina 1 jato e diversos - MULTIPLEX PCR (Metodologia in house)		
				Neisseria - Captura Híbrida	Captura Híbrida, Qiagen		
				Chlamydia PCR	Diversos		
	HH V1e 2	Nested-PCR) Método in house	Diversos, liquor	Chlamydia AC IgG, IgM e IgA	Imunofluorescência - Calmydya Trachomatis		
				MICROARRAY - CLART GENOMICA	Diversos, liquor, sangue	Trichomonas - Microscopia	Secreção genital, urina 1 jato
				Imunoensaio Enzimático-IgG e IgM	Liquoi		
				Quimioluminescência - IgG E IgM	Soro		

LABORATÓRIO	M. O	MÉTODO/MATERIAL	OUTRAS DSTs		
FLEURY	TP	Quimioluminescência com micropartículas (CMIA)	Soro	Mycoplasma spp e Ureaplasma urealyticum/parvum	Cultura e antibiograma
		Venereal Disease Research Laboratory (VDRL); - Elisa para imunoglobulina total.	Líquor	Neisseria PCR	Diversos
				Neisseria Sorologia	Fixação do complemento
		Reação de flocação com antígeno não treponêmico (RPR - Rapid Plasm Reagin).	Soro	Neisseria Pesquisa Antígenos bacterianos	Aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais – Soro e Líquor
		Exame microscópico em campo escuro e após coloração de Fontana-Tribondeau.	Exsudato de lesão genital, anal ou oral.	Neisseria C5 - Componente do complemento	Nefelometria - soro
	HH V1e 2	Imunoenzimático para anticorpos da classe IgG. - Imunoenzimático para	Soro	Trichomonas - Microscopia	Diversos
				Trichomonas - Cultura	Diversos

	IgM - Imunofluorescência indireta para anticorpos da classe IgM (exame confirmatório)		Chlamydia Microscopia	Diversos
	PCR	líquor, sangue ou material de lesão de pele, ocular, de mucosa genital ou oral. Lavado broncoalveolar, líquido amniótico, aspirado de medula óssea, urina, esperma e tecido fresco, (desempenho deste teste nestes materiais não foi tecnicamente verificado.)	Chlamydia AC IgG, IgM e IgA	sero
			Chlamydia PCR	Diversos
H.D	GRAM	lesão genital, anal ou oral		

LABORATÓRIO	M.O	MÉTODO/MATERIAL	OUTRAS DSTs
-------------	-----	-----------------	-------------

<b>DB DIAGNÓSTICOS</b>	TP	FTA-ABS - ANTICORPO S IgG	Líquor	DST PCR: Chlamydia trachomatis; Neisseria gonorrhoeae; Mycoplasma genitalium; Mycoplasma hominis; Ureaplasma urealyticum; Trichomonas vaginalis	
		Microscopia em campo escuro	Secreção genital		Neisseria- Captura Híbrida, cultura e PCR
		Quimioluminescência AC totais	Soro		
	HHV1 e2	PCR Plasma, Líquor e Líquido Amniótico, Sangue total e secreção genital			Trichomonas - Microscopia a fresco
					Mycoplasma e Ureaplasma Cultura
	HD	Microscopia- GRAM			PCR- quantitativo Mycoplasma hominis
<b>QUEST</b>	TP	Imunofluorescência Assay (IFA)	Líquor	Chlamydia trachomatis IgA IgG IgM	
		Indirect Fluorescence Assay (IFA) IGG IGM	Soro	Chlamydia trachomatis PCR	
	Treponema pallidum Particle Agglutination (TP-PA) Test - Particle Agglutination	Soro	Chlamydia trachomatis HIBRIDIZAÇÃO		
	PCR	Plasma, Líquor, Sangue total e secreção genital	SureSwab®, Mycoplasma/Ureaplasma Panel, PCR: M. hominis DNA, M. genitalium DNA, M. Ureaplasma spp U. parvum DNA, U. urealyticum DNA		
	IMUNOENSAIO - RPRT. pallidum Antibody, Particle Agglutination, FTABS- The FTA-ABS em		SureSwab® Ureaplasma species, PCR	U. parvum DNA, U. urealyticum DNA	
		Mycoplasma hominis/ Ureaplasma Culture	Neisseria gonorrhoeae RNA, TMA: Dual Kinetic Assay (DKA) • Target Capture • Transcription-Mediated Amplification (TMA)		

	SORO	Chlamydia/Neisseria gonorrhoeae RNA, TMA with Reflex to Alternate Target: in vaginal, endocervical and urethral swabs or urine from men and women.
		Chlamydia trachomatis/ Neisseria gonorrhoeae RNA, TMA; SureSwab® Trichomonas Vaginalis RNA, Qualitative, TMA SureSwab® RNA TMA

LABORATÓRIO	M.O	MÉTODO / MATERIAL	OUTRAS DSTs	
HERMES PARDINI	TP	T pallidum - IgG IgM Imunofluorescência indireta - FTABS - soro, liquor	DST PCR	Chlamydia trachomatis; Neisseria gonorrhoeae; Mycoplasma genitalium; Mycoplasma hominis; Ureaplasma urealyticum; Trichomonas vaginalis
		Sífilis neonatal- Teste do pezinho	MICOPLASMA, PCR	Mycoplasma hominis Mycoplasma genitalium
		T.pallidum, AC totais	Ureaplasma - cultura	Ureaplasma urealyticum
		Vdrl	Chlamydia trachomatis - imunofluorescência direta	
		Treponema (Qualitativo)	CHLAMYDIA TRACHOMATIS - SOROLOGIA igg, igm, iga	
			Chlamydia trachomatis-neisseria gonorrhoeae (pcr)	
	HHV 1 e 2	PCR para Herpes Vírus	Neisseria Cultura	
		Herpes simples virus 1 e 2, pcr e genotipagem	Neisseria Microscopia	

	Herpesvirus simples 1 e 2 IGG e IGM		Neisseria ANTIGENOS BACTERIANOS, PESQUISA
	Pesquisa de células herpéticas		
HD	H. ducreyi – pesquisa por microscopia		Anticorpos anti gonococos igg
			Trichomonas Pesquisa - Microscopia