

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Avaliação de testes para o diagnóstico de infecções por  
*Chlamydia trachomatis* e perfil de pessoas infectadas**

**JOSIANE DE SOUZA VIANA MORAES**

**Orientadora: Fátima Soares Motta Noronha**

**Belo Horizonte, Fevereiro 2009.**

**JOSIANE DE SOUZA VIANA MORAES**

**Avaliação de testes para o diagnóstico de infecções por  
*Chlamydia trachomatis* e perfil de pessoas infectadas**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, ICB, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**Orientadora: Profa. Fátima Soares Motta Noronha**

**Belo Horizonte, Fevereiro 2009.**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Microrganismos Intracelulares do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e no Instituto Hermes Pardini

## Colaboradores

Haleta Evangelista de Lima  
Pós-Doutoranda no Departamento de Microbiologia

Milena Batista de Oliveira  
Doutoranda no Departamento de Microbiologia

Apoio financeiro:  
CNPq- Fapemig- Capes-PRPq/UFMG

***“A satisfação está no esforço feito para alcançar o objetivo e não em tê-lo alcançado”***

***Gandhi***

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus, pela presença em minha vida, por fazer de mim a pessoa que sou, feliz, saudável e com vontade enorme de viver.

Aos meus pais, pela educação que me deram e por me mostrar os verdadeiros valores da vida. Pelo carinho e cuidado que nunca deixaram de me dar, principalmente durante esta trajetória.

Aos meus irmãos, Adriano e Cristiane por acreditarem em mim, mais do que eu mesma. Está conquista é nossa!

Aos meus cunhados, Chrisley e Paulo. Obrigada pelo apoio e pela torcida constante.

Aos meus lindos sobrinhos, Lara, Thiago, Samuel e Matheus. Obrigado por fazer de momentos tensos, uma enorme descontração e alegria. Titia ama vocês.

Agradeço toda a minha família, tios, tias, primos e primas, especialmente a minha linda vovó Luzia. Obrigada por tudo, por me apoiar e pela torcida constante. Beijos.

Ao Eduardo pelo incentivo aos estudos e por me ensinar ver o mundo com outros olhos.

À professora Dra. Fátima Soares Motta Noronha, por acreditar em mim, pela orientação e respeito durante toda esta trajetória.

À Haleta e Milena por me receber de braços abertos no Laboratório e por todos os ensinamentos que me deram ao decorrer deste trabalho. Sem vocês esta trajetória seria mais difícil.

Aos meus amigos de longa trajetória, Ariana, Cássia, Deuzira, Fabiana, Genilson, Hudson, Lillian e Minalda. Obrigada por fazer parte da minha vida, por estarem ao meu lado, mesmo quando estamos longe. Obrigada pela torcida.

Aos colegas do Laboratório Labmic, Adriano, Camila, Gracielle, Ludmila, Jaqueline, Jordana, Juliana, Matheus, Rafael Ramiro, Rafael Palhares e a professora Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli. Obrigada pelo apoio e convivência durante a realização deste trabalho. A querida Maira, agradeço imensamente a ajuda prestada na realização dos experimentos.

A todos aos amigos da pós-graduação, pela amizade e pela companhia durante esta trajetória.

A todos os amigos do Instituto Hermes Pardini, pela ajuda direta ou indireta. Este laboratório é a minha segunda casa e certamente vocês são especiais na minha vida! À Mireille, Patrícia e Renata por serem referencial na minha vida acadêmica, e por mostrar que tudo é possível quando se tem desejo e determinação. Angela, obrigada pela amizade e pelos conselhos! Aos amigos da Culturas Especiais, obrigada pela convivência de vários anos, pelo respeito, carinho e momentos de diversão. Rodrigo, obrigada pelo incentivo, atenção, interesse e por se mostrar sempre disposto a me ajudar neste projeto!

À minha amiga Renata, obrigada pelo incentivo constante na realização da prova do Mestrado, por me direcionar nesta trajetória e por me tranquilizar nas horas mais difíceis! Você é muito especial!

Ao meu amigo Jairo, a vida é feita de momentos felizes e um deles certamente foi conquistar a sua amizade! Obrigada por estar sempre ao meu lado!

Ao Elso, por cuidar de mim! Você é um anjo!

As minhas queridas amigas da faculdade, Márcia, Luciana, Érika, Fernanda Magalhães, Fernanda Pimentel, Daniele e Alessandra. Obrigada pelo apoio e pela amizade. E em especial a minha amiga e irmã de coração, Verônica. Obrigada pelo apoio, incentivo, de me ouvir e se mostrar sempre disposta a me ajudar!

Ao Instituto Hermes Pardini, pela autorização das coletas. Aos coordenadores, supervisores e colhedores pela realização das mesmas. Aos pacientes pela adesão neste projeto. Muito obrigada, sem vocês a realização deste projeto não seria possível.

Ao Douglas, pelos auxílios e por se mostrar sempre disposto a me ajudar!

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos durante o período de mestrado.

A todas as pessoas de que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros Agradecimentos.

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	IV
Lista de tabelas.....	VI
Lista de anexos .....	VII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	VIII
Resumo .....	X
Abstract .....	XII
<b>I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
1. Características gerais de <i>Chlamydiaceae</i> e classificação taxonômica.....	1
1.1.Ciclo de desenvolvimento de <i>Chlamydiaceae</i> .....	1
2. <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	2
3. Manifestações clínicas da infecção por <i>C. trachomatis</i> no trato genital.....	4
3.1. Infecção por <i>C. trachomatis</i> no trato genital feminino.....	4
3.2. Infecção clamidial e gravidez .....	5
3.3. Infecção por <i>C. trachomatis</i> no trato genital de homens.....	5
3.4. Linfagranuloma venéreo.....	6
4. Métodos para o diagnóstico das infecções por <i>C. trachomatis</i> .....	6
4.1. Cultivo celular.....	7
4.2. Técnicas de imunofluorescência direta (IFD).....	8
4.3. Testes de biologia molecular.....	9
5. Epidemiologia das infecções genitais por <i>C. trachomatis</i> .....	11
6. Microbiota vaginal.....	13
<b>II. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>III.OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
4.1. População estudada.....	19
4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão .....	19



4.2. Coleta do espécime clínico.....	20
4.2.1. Amostras clínicas de homens.....	20
4.2.2. Amostras clínicas de mulheres.....	20
4.3. Coloração pelo método de Gram.....	21
4.4. Pesquisa de <i>C. trachomatis</i> por imunofluorescência direta.....	21
4.5. Preparo dos espécimes clínicos para os testes moleculares.....	22
4.5.1. Purificação do DNA das amostras clínicas após o processo de lise...	22
4.5.2. Amplificação do gene da $\beta$ -globina.....	23
4.6. PCR para o plasmídio críptico <i>C. trachomatis</i> .....	24
4.6.1. PCR utilizando os iniciadores HL1 e HL2.....	24
4.6.2. PCR utilizando os iniciadores KL1 e KL2.....	25
4.6.3. Análise dos produtos de PCR.....	25
4.7. Nested-PCR para a amplificação do gene <i>omp1</i> de <i>C. trachomatis</i> .....	25
4.7.1. Análise dos produtos de PCR.....	26
5. Determinação da sensibilidade e especificidade das PCR para a detecção do plasmídio críptico.....	27
5.1 Análises dos resultados e estatística.....	28
V- Resultados.....	29
5.1. Coleta da população estudada.....	29
5.1.1 - Características da população estudada.....	30
6. Pesquisa da infecção por <i>C. trachomatis</i> por diferentes testes diagnósticos.	30
6.1. Pesquisa do gene da $\beta$ -globina .....	30
6.2 - Pesquisa de <i>C. trachomatis</i> pela amplificação de material genético.....	31
6.2.1. PCR utilizando os iniciadores HL1 e HL2.....	31
6.2.2. PCR utilizando os iniciadores KL1 e KL2.....	32
6.3. Pesquisa de <i>C. trachomatis</i> por imunofluorescência direta.....	33
7. Avaliação dos métodos utilizados.....	34
7.1. Determinação da sensibilidade e especificidade das PCR <i>in house</i> .....	34
8. Pesquisa para <i>C. trachomatis</i> por Nested-PCR.....	36
9. Frequência de <i>C. trachomatis</i> na população avaliada.....	36
10. Avaliação da microbiota genital na população feminina participante do estudo.....	37

10.1. Microbiota dos espécimes clínicos da população infectada.....	38
11. Avaliação do número de piócitos nos espécimes clínicos da população estudada.....	40
11.1. Números de piócitos nos espécimes clínicos da população infectada...	40
12. Manifestações clínicas relatadas pela população avaliada.....	40
12.1. Manifestação clínica de indivíduos infectados.....	43
13. Uso de método contraceptível da população avaliada.....	44
13.1. Método contraceptível utilizado por homens e mulheres infectados.....	46
14. Faixa etária da população avaliada.....	47
14.1. Faixa etária dos indivíduos infectados.....	48
15. Escolaridade da população em estudo.....	50
15.1. Escolaridade dos indivíduos infectados.....	50
16. Estado civil da população estudada.....	51
16.1. Estado civil de homens e mulheres infectados por <i>C. trachomatis</i> .....	51
17. Assistência médica da população avaliada.....	52
17.1. Assistência médica dos indivíduos infectados.....	52
VI. Discussão.....	56
VII. CONCLUSÕES.....	76
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
IX- ANEXOS.....	94

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de <i>Chlamydiaceae</i> .....	2
Figura 2. Esquema do gene <i>omp1</i> .....	3
Figura 3. Manifestações genitais provocadas pela infecção por <i>C. trachomatis</i> ...	6
Figura 4. Número de pessoas que aceitaram participar deste estudo no decorrer do período de Outubro de 2007 a Setembro de 2008.....	29
Figura 5. População de homens e mulheres que buscaram a pesquisa de <i>C. trachomatis</i> pelo método de imunofluorescência direta nas unidades do Instituto Hermes Pardini e aderiram ao estudo.....	30
Figura 6. Pesquisa do fragmento do gene da $\beta$ -globina nos espécimes clínicas.....	31
Figura 7. Detecção da infecção por <i>C. trachomatis</i> pela amplificação de um fragmento de 512 pb do plasmídeo críptico da bactéria.....	32
Figura 8. Detecção da infecção por <i>C. trachomatis</i> pela amplificação de um fragmento de 241 pb do plasmídeo críptico da bactéria.....	32
Figura 9. Detecção da infecção por <i>C. trachomatis</i> pelo método de imunofluorescência direta.....	33
Figura 10. Frequência da infecção por <i>C. trachomatis</i> detectada pela utilização de três métodos de diagnóstico.....	35
Figura 11. Detecção da infecção por <i>C. trachomatis</i> por <i>Nested-PCR</i> para a amplificação de um fragmento de 1015 pb do gene <i>omp1</i> da bactéria.....	36
Figura 12. Frequência de <i>C. trachomatis</i> nos indivíduos participantes deste estudo.....	37
Figura 13. Aspecto microscópico da microbiota de espécimes vaginais de mulheres que participaram do estudo.....	38
Figura 14. Representação gráfica dos tipos de população microbiana dos espécimes vaginais das mulheres envolvidas neste estudo.....	38
Figura 15. População microbiana de espécimes vaginais de mulheres infectadas que participaram do estudo.....	39
Figura 16. Foto ilustrativa de esfregaço de secreção uretral masculina infectada.....	39
Figura 17. Avaliação da presença de piócitos em espécimes clínicos de	

homens e mulheres envolvidos neste estudo.....	41
Figura 18. Número de piócitos nos espécimes clínicos da população estudada e da infectada.....	41
Figura 19. Manifestações clínicas declaradas pelas mulheres envolvidas em estudo.....	42
Figura 20. Manifestações clínicas relatadas pelos homens envolvidos neste estudo.....	42
Figura 21. Uso de preservativo masculino nas relações sexuais.....	45
Figura 22. Utilização de método contraceptível pelas mulheres participantes do estudo.....	45
Figura 23. Método contraceptível utilizado pela população feminina participante do estudo.....	46
Figura 24. Utilização de preservativo nas relações sexuais por homens infectados ou não por <i>C. trachomatis</i> .....	47
Figura 25. Métodos contraceptivos utilizados por mulheres apresentando a infecção por <i>C. trachomatis</i> .....	48
Figura 26. Faixas etárias da população de homens e mulheres participantes do estudo.....	49
Figura 27. Faixas etárias de indivíduos positivos para a pesquisa da infecção por <i>C. trachomatis</i> .....	49
Figura 28. Escolaridade de homens e mulheres participantes do estudo.....	50
Figura 29. Escolaridade de homens e mulheres positivos para a infecção por <i>C. trachomatis</i> .....	51
Figura 30. Estado civil de homens e mulheres participantes do estudo.....	52
Figura 31. Estado civil de homens e mulheres positivos para a infecção por <i>C. trachomatis</i> .....	53
Figura 32. Porcentagem de homens e mulheres que possuem assistência médica privada.....	54
Figura 33. Porcentagem do grupo em estudo que realizam consultas e exames preventivos anualmente.....	54
Figura 34. Relação de pessoas infectadas e aquisição de plano de saúde.....	55
Figura 35. Relação de homens e mulheres infectados e a realização de exames preventivos anualmente.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Seqüência dos iniciadores para a amplificação de uma região do gene da $\beta$ -globina e tamanho do fragmento amplificado.....	23
Tabela 2. Seqüência dos iniciadores (HL1/HL2) para a amplificação de uma região do gene do plasmídio críptico e tamanho do fragmento.....	24
Tabela 3. Seqüência dos iniciadores (KL1/KL2) para amplificação de uma região do plasmídio críptico e tamanho do fragmento amplificado.....	25
Tabela 4. Seqüências dos iniciadores para a amplificação de uma região do gene <i>omp1</i> e tamanho do fragmento amplificado.....	26
Tabela 5. Avaliação da validade de um teste diagnóstico .....	27
Tabela 6. Comparação dos três métodos de diagnóstico utilizados para a pesquisa da infecção por <i>C. trachomatis</i> .....	35
Tabela 7. Sinais, sintomas e/ou manifestações clínicas da população feminina em consequência da infecção por <i>C. trachomatis</i> .....	43
Tabela 8. Sintomatologia, sinal e/ou manifestação clínica da população masculina infectada por <i>C. trachomatis</i> .....	44

## LISTA DE ANEXO

<b>Anexo 1.</b> Termo de consentimento para pesquisa.....	<b>94</b>
<b>Anexo 2.</b> Questionário para o sexo feminino.....	<b>95</b>
<b>Anexo 3.</b> Questionário para o sexo masculino.....	<b>96</b>
<b>Anexo 4.</b> Aprovação do Comitê de Ética.....	<b>98</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
CE	Corpo elementar
CR	Corpo reticular
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DGN	Diplococos Gram negativos
DIP	Doença inflamatória pélvica
DIU	Dispositivo Intra Uterino
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
DTT	ditiotreitól
DST	Doença sexualmente transmissível
EIA	Ensaio imunoenzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HIV	Vírus de imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
IFD	Imunofluorencência direta
IgG	Imunoglobulinas
IHP	Instituto Hermes Pardini
Kb	Kilobases
Kda	Quilo Dalton
LB	Meio Luria Bertani
LCR	Reação em cadeia ligase
LGV	Linfogranuloma venéreo
LPMN	Leucócitos polimorfonucleares
LPS	Lipopolissacarídeo
MIF	Microimunofluorescência
mg	miligrama
ml	Mililitro
MOMP	<i>Major Outer Membrane Protein</i> (Principal proteína de membrana externa)

nm	Nanômetro
NAAT	Teste de amplificação de ácido nucléico
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Salina Tamponada com Fosfato)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RPM	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
TBE	Tampão Tris-Borato EDTA
TMA	Amplificação mediada por transcrição
UFC	Unidade formadora de colônia
V	Volts
µg	Micrograma
µL	Microlitro



## Resumo

No trato genital de mulheres infectadas *Chlamydia trachomatis* pode causar cervicites, uretrites, doença inflamatória pélvica, obstrução tubária e infertilidade. Em homens é responsável por uretrites, epididimite e prostatite. Entretanto, 50% dos homens e 80% mulheres infectados são assintomáticos. Esta característica realça a importância de métodos de diagnósticos eficazes e do tratamento precoce para indivíduos infectados, estratégias necessárias na prevenção de seqüelas e na redução de reservatórios na população. Neste estudo avaliamos uma população de homens e mulheres, composta por 169 indivíduos, que buscou, no Instituto Hermes Pardini, a pesquisa de *C. trachomatis* em seus espécimes clínicos pelo método de imunofluorescência direta. Esta metodologia comercial foi comparada com dois testes de PCR, PCR-HL1/HL2, desenhado por nosso grupo e PCR-KL1/KL2, já utilizado no diagnóstico da infecção. Além da freqüência da infecção na população analisada investigamos o perfil dos indivíduos infectados. A freqüência de *C. trachomatis* na população avaliada foi de 16,6%, sendo 32,1% na população masculina e 4,3% na feminina. Houve uma similaridade de 82,2% entre os três testes utilizados, mas os testes moleculares mostraram uma maior sensibilidade (50%) nos casos considerados verdadeiros positivos com uma concordância de 90,5%. PCR-HL1/HL2 apresentou maior especificidade, mas menor sensibilidade, que PCR-KL1/KL2. As queixas relatadas por 87,5% dos homens infectados foram, secreção uretral (37,5%), dor ao urinar (12,5%) e associação dos dois sintomas (29,2%). É de chamar a atenção que 12,5% de homens infectados se disseram assintomáticos. No sexo feminino, duas das quatro mulheres com a infecção apresentaram apenas histórico de aborto. Não foi possível encontrar uma associação entre presença da infecção e alterações na microbiota vaginal. A infecção esteve presente em 78,6% de indivíduos apresentando menos de cinco leucócitos polimorfonucleares por campo após coloração pelo método de Gram. O uso de preservativo não foi relacionado à proteção contra a infecção em 54,2% dos homens e na população feminina a infecção foi mais freqüente (50%) em mulheres que utilizavam o anticoncepcional injetável. A faixa etária entre 18 e 30 anos apresentou o maior número de indivíduos infectados (64,3%), sendo que os homens solteiros (58,3%) e mulheres casadas (3 das 4 positivas), ambos com alto nível de

escolaridade foram os mais acometidos pela infecção. A posse de plano de saúde não demonstrou ser um fator determinante no controle da infecção por *C.trachomatis*. O grupo aqui analisado difere de populações avaliadas em outros estudos no Brasil tendo sido observada uma alta frequência de infecção por *C. trachomatis* no sexo masculino. Nossos dados mostram a importância do controle da infecção por *C. trachomatis* em ambos os sexos para a redução das graves seqüelas e transmissão da infecção para os parceiros do sexo.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis*, uretrites, cervicites, DST, Triagem para *C. trachomatis*

## Abstract

In the genital tract of infected women, *Chlamydia trachomatis* can cause cervicitis, urethritis, Pelvic inflammatory disease tube obstructions and infertility. In men, it is responsible for urethritis, epididimitis and prostatitis. Nevertheless, 50% of infected men and 80% of infected women remain asymptomatic. This particular characteristic emphasizes the importance of efficient diagnostic methods and earlier treatment for infected individuals. Those are crucial strategies to prevent the outcomes of this infection and also to reduce reservoirs among the population. In this present study, we evaluated a male and female population comprised of 169 individuals who were applying for *C. trachomatis* diagnostic test at Instituto Hermes Pardini. The test used clinical specimens to perform the direct immunofluorescence methodology. This commercialized method was compared to two PCR based tests, PCR-HL1/HL2 designed by our group and PCR-KL1/KL2 which is already in routine use for diagnosis of infection. Besides the prevalence of infection in the study population, we investigated the profile of the infected individuals. The prevalence of *C. trachomatis* infection in the study population was 16.6%, being 32.1% among the male population and 4.3% among the female population. The estimated similarity among the three tests was 82.2%. However, the molecular tests showed a highest sensitivity (50%) with a agreement index of 90,5%. The PCR-HL1/HL2 presented the highest specificity, but lower sensitivity than PCR-KL1/KL2. The symptoms reported by 87.5% of male infected individuals was: urethral secretion (37.5%), pain while urinating (12.5%) and both (29.2%). It is important to notice that 12.5% of male infected individuals reported themselves as asymptomatic. For female infected individuals, two of four women reported previous abortion experience. It was not possible to find any association between presence of infection and vaginal microbiote alterations. The infection was diagnosed in 78.6% which presented less than five leucocytes per field after Gram staining. The use of preservatives was not correlated to protection against the *C. trachomatis* infection in 54.2% of male and more frequent in females (50%) that used injectable contraceptives.

The age range of 18 to 30 years presented the highest number of infected individuals (64.3%), considering that 58.3% were single males, three from four women were

married and both with high educational level. The use of private social security service did not demonstrate to be a determinant factor in the control of *C. trachomatis* infection. The present study population differs from other populations evaluated in other studies in Brazil which presented high prevalence of *C. trachomatis* among the male population. Therefore, our data demonstrated the necessity of *C. trachomatis* infection control in both genders in order to reduce severe outcomes and the transmission of infection to intercourse partners.

Key Words: *Chlamydia trachomatis*, urethritis, cervicitis, Screening for *C. trachomatis*.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Características gerais de *Chlamydiaceae* e classificação taxonômica

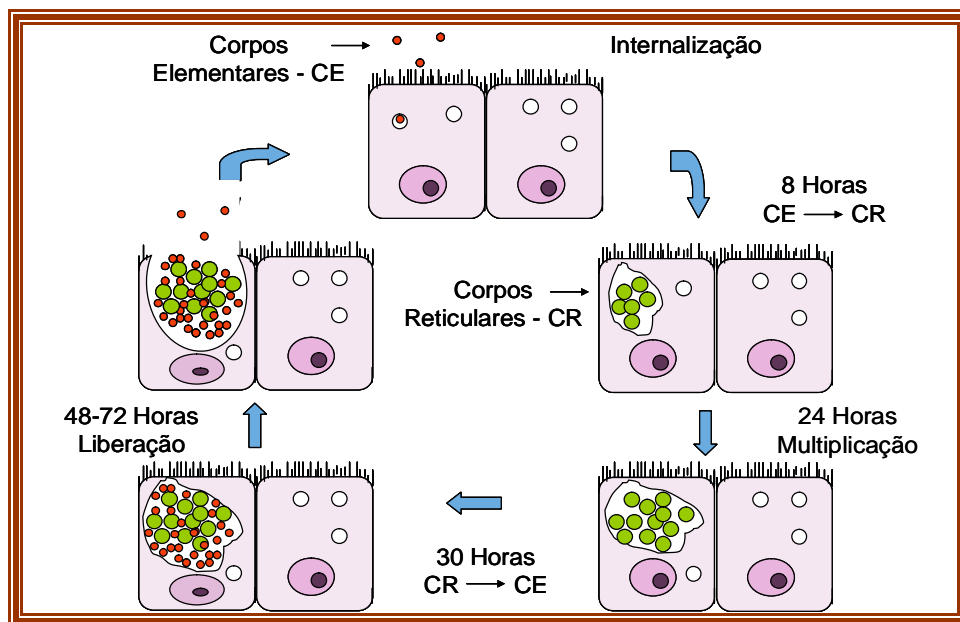
Os componentes da família *Chlamydiaceae* foram considerados vírus por muitos anos. Entretanto, a partir de 1964 foram observadas características bacterianas tais como parede celular, ribossomos, DNA, RNA e funções metabólicas para a sua replicação e produção de ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos. Apesar de possuírem as vias metabólicas necessárias, esta bactéria não produz ATP, necessitando, então, parasitar células hospedeiras para a obtenção destes compostos ricos em energia para que possam desenvolver suas atividades de biossíntese (Peeling et al., 1996; Miranda et al., 2004; Murray et al., 2004; Budai, 2007).

Estas bactérias possuem paredes celulares análogas à de bactérias Gram-negativas (Numazaki et al., 1989; Cunningham et al., 2008), entretanto, a sua parede não contém o componente peptidoglicano (Cevenini et al., 2002). Estas bactérias, sendo parasitas intracelulares obrigatórias, infectam e se multiplicam somente em células eucariotas (Fukuda et al., 2005; Currie et al., 2007).

Até recentemente, na família *Chlamydiaceae* era conhecido apenas o gênero *Chlamydia*, com duas espécies, *C. trachomatis* e *C. psittaci*, com vários sorovares (Page, 1967; Everett et al., 2000). Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, principalmente análise dos genes 16S e 23S do RNAr, foi possível a divisão da família *Chlamydiaceae* em dois gêneros *Chlamydia* e *Chlamydophila* e nove espécies. O gênero *Chlamydia* ficou constituído pelas seguintes espécies: *Chlamydia trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, e o gênero *Chlamydophila* com as espécies: *Chlamydophila psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. percorum*, *C. felis*, *C. caviae* e *C. abortus* (Everett et al., 1999; Hartley et al., 2001; Hammerschlag, 2007).

#### 1.1. Ciclo de desenvolvimento de *Chlamydiaceae*

De acordo com a descrição clássica, todos os componentes da família *Chlamydiaceae* sofrem um ciclo de desenvolvimento bifásico (**Figura 1**) com formas que são distintas, morfológicamente e funcionalmente: o pequeno corpo elementar (CE) esférico, medindo de 300 a 400 nm de diâmetro e o corpo reticular (CR), maior, medindo 800 a 1.000 nm de diâmetro (Villareal et al., 2001; Fukuda et al., 2005).



**Figura 1. Ciclo de desenvolvimento de *Chlamydiaceae*.** Os corpos elementares estão representados em vermelhos e os corpos reticulares em verde.

Este ciclo de infecção se inicia quando a forma extracelular do organismo, o corpo elementar (CE), infeccioso, mas metabolicamente inativo (Peeling *et al.*, 1996; Dieterle, 2008), se liga e estimula sua internalização por células hospedeiras eucarióticas, normalmente células epiteliais ou tipo-epitelial. Uma vez ligadas a receptores na superfície das células epiteliais susceptíveis, *Chlamydiaceae* são endocitadas e residem em um vacúolo de membrana que pode escapar da fusão fagossomal, formando inclusões características e se diferenciando para um corpo reticular (CR) maior e ativo metabolicamente. Durante a fase intracelular, até o término deste processo de desenvolvimento ativo os CRs multiplicam-se por divisão binária, e depois de 18 a 24 horas de multiplicação, se diferenciam para que voltem às formas CEs, formando vacúolos contendo de 100 a 1000 CEs. Depois de 30 a 84 horas são liberados da célula hospedeira por lise ou exocitose. Após sua liberação, os CEs encontram novas células hospedeiras para propagar a infecção (Peeling *et al.*, 1996; Villareal *et al.*, 2001; Seadi *et al.*, 2002; Hogan *et al.*, 2004; Fukuda *et al.*, 2005).

## 2. *Chlamydia trachomatis*

*C. trachomatis* é o agente bacteriano mais comum de casos relatados de infecções sexualmente transmissíveis nos Estados Unidos bem como em outros

países (Jespersen et al., 2005; Chernesky et al., 2006; Satterwhite et al., 2008). Atualmente, as diferentes linhagens de *C. trachomatis* estão agrupadas em 19 sorotipos, com base nas diferenças antigênicas de sua principal proteína de membrana externa (MOMP), todos eles com perfil genótipo típico bem estabelecido (Mossaman et al., 2008).

Os sorovariantes D a K (D, Da, E, F, G, Ga H, I, Ia, J e k) são considerados os patógenos bacterianos mais comuns transmitidos por via sexual, sendo responsáveis por cervicites e uretrites em homens e mulheres. Estas infecções podem apresentar várias complicações, entre elas, doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e infertilidade. Estes sorotipos estão também associados a conjuntivites e pneumonias em neonatos, resultado da infecção durante o nascimento (Hogan et al., 2004; Currie et al., 2007). Os sorovariantes L1, L2, L2a e L3 estão relacionados à outra infecção transmitida por via sexual, o linfogranuloma venéreo. Estes sorotipos têm tropismo por células dos gânglios inguinais (Spaargaren et al., 2005; Fukuda et al., 2005). Os sorovariantes A, B, Ba e C estão associados ao tracoma ocular (Morré et al., 2000; Solomon et al., 2004), um agravo ainda comum em países e regiões sub-desenvolvidos.

*C. trachomatis* contém um único cromossomo de aproximadamente 1.043.000-bp (58,7% Adenina+Timina e 41,3% Guanina+Citosina) e um plasmídio de 7.493 pb ocorrendo em aproximadamente 7 a 10 cópias (Lopez et al., 2004). O gene *omp1*, que codifica a principal e mais abundante proteína de superfície da bactéria (MOMP) (**Figura 2**) (Soloman et al., 2004), tem sido utilizado para distinguir as linhagens de *C. trachomatis* (Everett et al., 1999). Este gene exibe uma heterogeneidade em sua seqüência de nucleotídeos, principalmente em quatro segmentos hipervariáveis denominados segmentos variáveis VS1 a VS4 (Dean & Millman, 1997; Storhard et al., 1998; Lima et al., 2007; Gao et., 2008). A análise destes domínios variáveis corroborou a existência dos diferentes sorovariantes.



**Figura 2. Esquema do gene *omp1*.** As regiões com a letra C representam as regiões conservadas e as regiões com a sigla VD representam as quatro regiões variáveis.

### **3. Manifestações clínicas da infecção por *C. trachomatis* no trato genital**

A infecção por *C. trachomatis* é, muitas vezes, tratada como assunto de cuidados da saúde da mulher, uma vez que as manifestações e conseqüências são mais intensas para a saúde reprodutiva da mulher do que de homens (Paavonen et al., 1999; Cunningham et al., 2008). Entretanto, a infecção clamidial não tratada em homens pode servir como reservatório importante, resultando em transmissão repetida da infecção para parceiros do sexo (Joesoef et al., 2006; Gaydos et al., 2008). Vários estudos demonstram que cerca 50% dos homens e 80% das de indivíduos infectados por *C. trachomatis* podem carrear a infecção de forma assintomática (Darville et al., 2005; Kucinskiene et al., 2006; Hsu et al., 2008) e pode persistir naturalmente por períodos prolongados (Veldhuijzen et al., 2006).

#### **3.1. Infecção por *C. trachomatis* no trato genital feminino**

Em mulheres, a infecção clamidial no trato genital, tem afinidade pelas células colunares, sendo o endocervix o principal alvo. Essa infecção é, muito freqüentemente, assintomática e pode ter efeitos graves como um efeito potencial em longo prazo na capacidade reprodutiva feminina (Bakken et al., 2006). Quando a infecção é sintomática, pode causar uma descarga vaginal mucóide inodora, tipicamente com prurido externo (Miller et al., 2006). A ascensão do microrganismo do trato geniturinário para o endométrio e para as trompas de Falópio pode provocar dor no ventre e anormalidades menstruais (Seadi et al., 2002; Michelon et al., 2005). O não diagnóstico e tratamento das uretrites e cervicites ocasionada pela infecção de *C. trachomatis* pode causar complicações secundárias sérias, como doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, ruptura prematuras das membranas, partos prematuros, fertilidade reduzida, infertilidade, conjuntivite e facilitação de transmissão do vírus de imunodeficiência humana (HIV) tipo I (Pannekoek et al., 2000; Kouri et al., 2002; Veldhuijzen et al., 2006; Cornetta et al., 2006; Gao et al., 2008). A associação entre neoplasia e carcinoma no cérvix com infecção genital por *C. trachomatis* também tem sido relatada (Cornetta et al., 2006).

A infecção urogenital por clamídia em mulheres inclui cervicites (**Figura 3a**) com descarga turva ou amarelada. O cérvix tende a sangrar facilmente quando é tocado com um *swab* ou uma espátula nos exames de prevenção e também nas



relações sexuais (Geisler et al., 2006). Entretanto, a infecção clamidial não pode ser distinguida de outras infecções somente pelos sintomas. Algumas mulheres com infecção por *C. trachomatis* desenvolvem uretrite, no qual os sintomas podem consistir de disúria sem freqüência ou urgência urinária. A descarga uretral pode ser extraída por compressão da uretra durante o exame pélvico (Marques et al., 2005; Miller et al., 2006).

### **3.2. Infecção clamidial e gravidez**

A transmissão de *C. trachomatis* de mães infectadas para seus filhos normalmente ocorre na hora do parto pela passagem da criança através do cérvix infectado, mas a possibilidade de infecção intra-uterina tem sido relatada em recém nascidos por cesárea com antecedentes maternos de ruptura de membranas amnióticas, e, mesmo pós-natal, o que seria possível pelo contato com a mãe (Vaz et al., 1999; Spiliopoulou et al., 2005). Recém-nascidos de mães infectadas têm risco aumentado de desenvolver complicações no pulmão e olhos tais como pneumonia e conjuntivite, nos primeiros dias e meses de vida, além de outros acometimentos como nascimentos prematuros e crianças com baixo peso (Cornetta et al., 2006; Rahangdale et al., 2006).

### **3.3. Infecção por *C. trachomatis* no trato genital de homens**

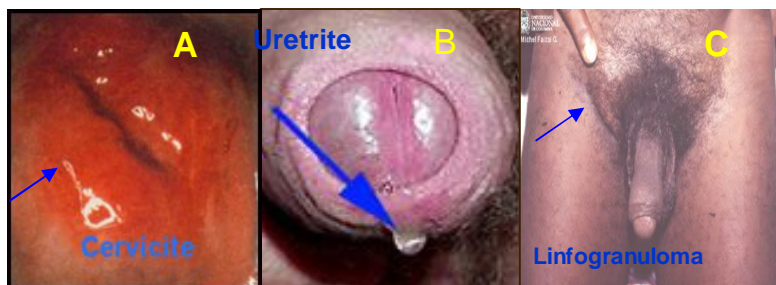
Em homens, a uretrite (**Figura 3b**) é o resultado mais comum de infecção por *C. trachomatis* no trato genital baixo (Boyadzhyan et al., 2004), e, quando os sinais e sintomas estão presentes, podem variar aparecendo de sete a 21 dias após a infecção. Pode-se manifestar em forma de disúria e corrimento uretral claro ou esbranquiçado que é observado pela manhã antes de urinar (Marques et al., 2005; Miller et al., 2006). Importante ressaltar alguns trabalhos relatando que pelo menos 50% dos homens com infecção por *C. trachomatis* não apresentam queixa de descarga uretral ou disúria (Marrazzo et al., 2006; Joesoef et al., 2006; Dieterle, 2008). Outras patologias, resultantes desta infecção, podem também acometer o homem como epididimite aguda, prostatite e conjuntivite (Spiliopoulou et al., 2005; Joesoef et al., 2006). O papel desta infecção em homens inférteis ainda é discutível. Trabalhos recentes sugerem que a bactéria possa atacar o espermatozoa e permanecer no citoplasma desta célula (Dieterle, 2008) e que, a exposição *in vitro*

de espermatozoides à bactéria apresentou alterações na mobilidade e viabilidade (morte prematura) de espermatozoides. Entretanto, o impacto da infecção por *C. trachomatis* na fertilidade masculina é, ainda, controverso (Pellati et al., 2008; Dieterle, 2008).

### 3.4. Linfagranuloma venéreo

Linfagranuloma venéreo (LVG) é uma doença sexualmente transmissível que se manifesta de forma sistêmica. Os sorovariantes responsáveis por esta doença são mais invasivos do que aqueles associados a infecções urogenitais (Mabey et al., 2002). Os sorovariantes do LVG infectam, predominantemente, os monócitos e macrófagos, passam através da superfície epitelial para região dos nódulos linfáticos, e podem causar infecção disseminada (Peeling et al., 1996).

É uma doença crônica que tem uma variedade de manifestações agudas a crônicas, incluindo síndrome inguinal, úlceras genitais e linfadenopatia femoral e inguinal (bulbões) (**Figura 3c**) com supurações. Subseqüente ao avanço linfático pode haver uma síndrome anorretal, com proctocolite e hiperplasia intestinal e do tecido linfático periretal. As duas síndromes podem ser acompanhadas de sintomas sistêmicos, incluindo febre, fadiga, mialgia, anorexia e artralgia. Se a doença não for tratada, o quadro pode se agravar ainda mais, levando a fístulas, elefantíase genital, pélvis fria e infertilidade (Spaargaren et al., 2005; Chen et al., 2006).



**Figura 3.** Manifestações genitais provocadas pela infecção por *C. trachomatis*  
(Fonte:www.aids.gov.br)

### 4. Métodos para o diagnóstico das infecções por *C. trachomatis*

As infecções urogenitais causadas por *C. trachomatis* estão distribuídas mundialmente e impõem, cada vez mais, um melhor controle epidemiológico e diagnóstico. É necessário realizar todos os esforços possíveis para se detectar e identificar as infecções por *C. trachomatis*, já que as enfermidades que causam são

muito importantes e também porque interagem sinergicamente com vírus e outras bactérias, aumentando a susceptibilidade dos hospedeiros a outras infecções (López et al., 2004) além da transmissão da doença para seu parceiro do sexo.

Atualmente, vários métodos são utilizados para o diagnóstico das infecções por *C. trachomatis* incluindo métodos citológicos, sorológicos, cultura, detecção direta de antígenos nas amostras clínicas e detecção ou amplificação de material genético da bactéria (Swain et al., 2003; Xiong et al., 2006). Cada uma dessas técnicas tem suas vantagens e desvantagens em termos de sensibilidade e especificidade e isso deve estar em mente durante a interpretação dos resultados de cada teste. Um fator crítico é a sensibilidade para a detecção da infecção, uma vez que o resultado falso-negativo permite que a infecção se dissemine ou ocasione um atraso no tratamento tendo como consequência todas as complicações associadas. O resultado falso-positivo traz como consequência um tratamento desnecessário, além de um desgaste para o paciente. Devido a estas limitações dos testes, o *Center for Disease Control* (CDC) em 2002 preconizou que um resultado positivo para a infecção de *C. trachomatis* é somente considerado quando a cultura é positiva ou quando dois testes não culturais são positivos simultaneamente.

#### **4.1. Cultivo celular**

Somente a partir de 1986, foi relatada a identificação de *C. trachomatis* em nosso país, pela técnica de cultura em células vivas (Frias et al., 2001). Um dos principais métodos empregados para a detecção de *C. trachomatis* e um dos primeiros a ser utilizado foi o isolamento da bactéria em cultura de células empregando fibroblastos murinos (células McCoy) (Lopez et al., 2004). A sensibilidade deste teste é, em geral, baixa, cerca de 60%, mas possui uma alta especificidade, de 100% e um potencial mínimo de contaminação, por isso é considerado como método padrão em processos médico-legais para investigar violação e abuso sexual de crianças (Black et al., 1997; Varella et al., 2000; Sadi et al., 2002; Marques et al., 2005).

Este método é trabalhoso, oneroso e necessita de cuidados especiais para a manutenção da bactéria viável durante o transporte das amostras clínicas. Embora várias linhagens celulares permitam o cultivo da bactéria, monocamadas de células McCoy, distribuídas em microplacas contendo lamínulas, são as mais utilizadas. A

cultura é realizada por inoculação do espécime clínico sobre a monocada de células. Se corpos elementares estão presentes e viáveis, os mesmos infectam as células e crescem em forma de inclusões citoplasmáticas (Black et al., 1997; Seadi et al., 1999).

Por este método, um teste é considerado positivo pela detecção de inclusões citoplasmáticas, após um período de cultivo de 48 a 72 horas em temperatura de 37°C. Estas inclusões, constituídas de corpos elementares e reticulares, podem ser identificadas pela coloração de May Grünwald-Giemsa (mais utilizada na década 70-80), ou pela utilização de iodo ou anticorpo monoclonal fluorescente (dirigidos contra a MOMP) (Lopes et al., 2004).

A vantagem da cultura é sua alta especificidade, baixa probabilidade de contaminação e a preservação do microrganismo para estudos adicionais, como o teste de suscetibilidade à terapia antimicrobiana e genotipagem (Black et al., 1997). Apresenta como desvantagem, a necessidade de infra-estrutura de laboratório muito onerosa e outras restrições como o tempo longo para obtenção do resultado além do fato de detectar apenas bactérias vivas. O resultado pode ser prejudicado por situações inadequadas de coleta, armazenamento e/ou transporte, o que diminui a sua sensibilidade, mesmo em laboratórios de excelência (Melles et al., 2000; Seadi et al., 2002).

#### **4.2. Técnicas de imunofluorescência direta (IFD)**

Com a identificação dos antígenos clamídias, tornou-se possível utilizar anticorpos específicos, conjugados com fluoresceína, dirigidos aos corpos elementares e reticulares para a detecção de *C. trachomatis* em espécimes clínicos. O emprego de anticorpos monoclonais em testes de imunofluorescência direta (IFD) na década de 80 veio facilitar o diagnóstico da bactéria, originando um método rápido, sensível, específico e de menor custo (Bagnoli et al., 1995; Seadi et al., 2002; Marques et al., 2005).

Atualmente, os anticorpos monoclonais dirigidos contra o LPS e a MOMP são os mais utilizados. Os anticorpos contra o LPS, favorecem reações cruzadas com outras bactérias Gram-negativas ou subtipos de *Chlamydia* spp., sendo então considerados menos específicos (Michelon et al., 2005), além de apresentar características de coloração inferiores às obtidas com anticorpos monoclonais

dirigidos contra a MOMP (López et al., 2004). Anticorpos dirigidos à MOMP oferecem menos resultados falso-positivos, por serem mais específicos. Um teste é considerado positivo quando o espécime clínico depois de fixado e corado apresenta no mínimo dez corpos elementares ou reticulares são visualizados sob um microscópio fluorescente (Zarakolu et al., 2008).

A IFD pode ser utilizada para a detecção de *C. trachomatis* em espécimes conjuntivais, retais e em amostras respiratórias de crianças recém-nascidas, mas é usado principalmente para amostras endocervicais e uretrais (Black et al., 1997; López et al., 2004). A IFD tem uma sensibilidade em torno de 80 a 90% e uma especificidade de 98 a 99% (Black et al., 1997; Michelon et al., 2005; Darville et al., 2005) em relação à cultura quando ambos são realizados em condições ótimas.

A desvantagem do método é a necessidade de um microscopista treinado devido ao critério de positividade ser subjetivo (Alencar et al., 1993; Frias et al., 2001; Seadi et al., 2002; Daoudi et al., 2004). É uma técnica suficientemente simples e rápida, não exigindo meios sofisticados de refrigeração para o transporte e estocagem da amostra. Atualmente, a IFD, utilizando anticorpos monoclonais específicos para a MOMP, é considerada uma das melhores técnicas de diagnóstico rápido disponível, além do mais, é a única que permite visualização da qualidade da amostra pela presença de células colunares epiteliais (López et al., 2004; Solomon et al., 2004).

#### **4.3. Testes de biologia molecular**

Técnicas de genética molecular têm sido cada vez mais utilizadas para a detecção de microrganismos difíceis de serem cultivados *in vitro*, como *C. trachomatis* e outros organismos de desenvolvimento lento (Santos et al., 2003). A partir de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos mostrou um grande avanço no diagnóstico da infecção por clamídia, por ser mais rápida e sensível e por não depender da viabilidade da amostra.

Testes de amplificação de ácido nucleico (NAAT) são altamente sensíveis e estão disponíveis comercialmente para o diagnóstico de infecção de *C. trachomatis*. Possui aprovação no *Food and Drug Administration* (FDA) para *swabs* cervical de mulheres e uretral de homens e urina de homens e mulheres. Esses testes têm uma alta sensibilidade, detectando de 10 a 20% mais casos de infecção genital por *C.*

*trachomatis* do que é possível se detectar com a cultura, enquanto retém a especificidade (Darville, 2005). Os espécimes são estáveis durante o transporte e podem suportar a demora entre coleta e processamento sem interferir na sensibilidade do teste (Currie et al., 2007).

O desenvolvimento da tecnologia de PCR em anos recentes permite a detecção de pequenas quantidades de ácido nucléico específico em espécimes clínicos e tem sido proposto por diferentes autores como uma alternativa para o diagnóstico de *C. trachomatis* (Kouri et al., 2002; Low et al., 2007; Lima et al., 2007). Esta técnica pode ser realizada a partir de vários espécimes clínicos, incluindo material endocervical, vaginal ou uretral e também em amostras de urina (Chernesky et al., 2006). Comparando-se a obtenção dos espécimes clínicos, a coleta de urina é um procedimento não invasivo, sendo, portanto mais aceito pelos indivíduos, evitando também o custo com profissionais e tempo consumido pela coleta (Gaydos et al., 2004; Xiong et al., 2006). Entretanto, a sensibilidade destes testes pode variar de 65 a 100%, em média e a especificidade varia de 95 a 100%, dependendo da origem da amostra, primeira urina, secreção uretral ou endocervical (Michelon et al., 2005; Horner et al., 2006).

A amplificação de ácidos nucléicos consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA ou RNA a partir de iniciadores (oligonucleotídeos) que são complementares à seqüência alvo do DNA ou RNA da bactéria (Seadi et al., 2002). Os principais alvos são o plasmídeo críptico e regiões do gene *omp1* (que codifica a MOMP). Estes testes são sensíveis e específicos quando comparados com outros testes usados para o diagnóstico de *C. trachomatis*, como a cultura, o imunoenzimático (EIA), a imunofluorescência direta e o ELISA (Santos et al., 2003; Xiong et al., 2006).

Os iniciadores mais utilizados na realização da PCR para o diagnóstico são os que possuem como alvo genes e regiões de múltiplas cópias, como o plasmídeo críptico. Testes tendo como alvo essas regiões oferecem como vantagem uma alta sensibilidade, embora já esteja descrita na literatura a existência de amostras clínicas de *C. trachomatis* que não possuem o plasmídeo (An et al., 1992; Thomas et al., 1997; Farencena et al., 1997; Black et al., 1997; Sothard et al., 1998; Seadi et al., 2002; Lima et al. 2007). Em um estudo realizado em 1993, Mahony et al. compararam cinco diferentes iniciadores para a identificação de *C. trachomatis* por

PCR, dois deles voltados para o plasmídio críptico, dois outros para o gene da MOMP e um para o DNA ribossomal. Estes autores observaram que as reações de PCR baseadas no plasmídio críptico são de 10 a 1000 vezes mais sensíveis que aqueles baseados em seqüências cromossomais.

Os testes comerciais disponíveis para o diagnóstico de *C. trachomatis* diferem em seu método de amplificação e no alvo de seqüências de ácidos nucléicos. A *Roche Amplicor*® (Roche Diagnostics) usa a reação em cadeia da polimerase (PCR); A *Abott LCx* utiliza a reação em cadeia da ligase (LCR), a *Becton Dickinson BD Probe Tec* utiliza uma PCR e tem como alvo seqüências no plasmídio críptico que são encontrados em aproximadamente 99% de linhagens de *C. trachomatis* e o *Gen Probe APTIMA* que usa amplificação mediada por transcrição (TMA) para detectar uma seqüência na unidade 23S do RNA ribossomal (Darville et al., 2005; Low et al., 2007).

Apesar das vantagens já descritas, os testes de diagnóstico baseado na amplificação do material genético apresentam algumas desvantagens. Eles são mais dispendiosos do que os outros métodos não baseados em cultura, mas de menor custo do que a cultura. E a possibilidade de problemas relacionados à inibição. Entretanto, atualmente, alguns autores defendem a adoção destes testes, uma vez que, a morbidade da infecção bem como o custo/benefício de identificação e tratamento de pessoas infectadas justifica sua adoção (Seadi et al., 2002; Spiliopoulou et al., 2005; Michelon et al., 2005).

## **5. Epidemiologia das infecções genitais por *C. trachomatis***

A infecção por *C. trachomatis* pode ser transmitida pelo contato sexual ou simplesmente pelo contato de uma mucosa com outra mucosa infectada (Michelon et al., 2005). A infecção por *C. trachomatis* permanece a doença sexualmente transmissível mais comum, no mundo, com uma estimativa de aproximadamente 92 milhões de indivíduos infectados a cada ano (Gaydos et al., 2004; Spiliopoulou et al., 2005; Yu et al., 2007; Dieterle et al., 2008). Este número pode estar ainda, subestimado, devido ao alto número de infecções assintomáticas no trato genital inferior de homens e mulheres. Dados indicam que o número de infecções assintomáticas é muito alto, sendo cerca de 50% em populações de homens e chegando a 80% em mulheres (Darville et al., 2005; Kucinskiene et al., 2006; Hsu et

al., 2008) Este grande grupo de infectados assintomáticos carrega não somente o risco das seqüelas de longo tempo, mas também sustentam a transmissão dentro da comunidade (Lima et al., 2007). Paralelamente, a falta da triagem preventiva da infecção causada por *C. trachomatis* em muitos países do mundo contribui para o desconhecimento da prevalência desta infecção (Kucinskiene et al., 2006). Como mencionado acima, acredita-se, desta forma, que o atual número de relatos de casos representa somente uma fração das populações infectadas (Daoudi et al., 2004; Gaydos et al., 2004; Chernesky, et al., 2006).

Em países onde estudos sobre a prevalência desta infecção são realizados, esta infecção clamidial, muitas vezes assintomática e de natureza persistente, está distribuída largamente na população, particularmente em pessoas jovens (Richardus et al., 2007). Estima-se que aproximadamente quatro milhões de casos de infecção genital ocorram nos Estados Unidos anualmente, e 50.000 mulheres a cada ano tornem-se inférteis devido ao resultado desta infecção (Spiliopoulou et al., 2005). As estimativas do CDC mostram que a infecção por *C. trachomatis* está tão amplamente disseminada que existem mais casos novos desta infecção do que outra DST, como sífilis, gonorréia, HPV, herpes e AIDS (Marques et al., 2005).

Estudos mostram que a prevalência da infecção por este agente sexualmente transmissível em jovens mulheres nos Estados Unidos tem variado de 2 a 7% entre estudantes de faculdade, de 4 a 12% entre mulheres atendidas em clínicas de planejamento familiar e de 6 a 20% entre mulheres atendidas em clínicas de doenças sexualmente transmissíveis (Darville, 2005). Em homens atendidos em clínica de prevenção e tratamento de doenças sexualmente transmissíveis, esta infecção pode variar de 4 a 20%. A infecção em recém-nascidos ocorre como resultado da exposição pré-natal e, segundo dados do CDC, aproximadamente 65% de bebês nascidos de mães infectadas tornam-se infectados durante a passagem pelo canal cervical (Black et al., 1997).

No Brasil, existe um número maior de estudos relacionada à infecção por *C. trachomatis* na população feminina, mas muito poucos relacionados ao sexo masculino. Além disso, dados reais de sua prevalência no Brasil ainda não existem, uma vez que a infecção causada por *C. trachomatis* não é de notificação obrigatória. Mesmo na população feminina os estudos sobre a frequência destas infecções estão, normalmente, direcionados a populações específicas tais como: trabalhadores



do sexo, clínicas de doenças sexualmente transmissíveis e clínicas de planejamento familiar. Todos os estudos, no entanto, vêm mostrando a importância dessa infecção silenciosa em nosso meio, uma vez que encontram taxas da infecção em mulheres que variam de 2,1% a 31,5% (Marques et al., 2005; Lima et al., 2007). No sexo masculino, os poucos trabalhos existentes mostram uma variação de 2% a 23,3% (Castro et al., 2000; Chitacumula et al., 2007; Fioravante et al., 2005; PN-DST/AIDS, 2008). A variação na frequência da infecção nas duas populações é resultado da avaliação de populações diversificadas e da utilização de metodologias também variadas.

Pesquisas epidemiológicas mostram que taxas de infecções por *C. trachomatis* estão diretamente relacionados a fatores de risco como: números de parceiros sexuais, idade, nível sócio-econômico, hábitos higiênicos, emprego de anticoncepcionais orais e a presença de outras infecções sexualmente transmissíveis (Kouri et al., 2002; Bamberger et al., 2003; Joesoef et al., 2006).

Um aspecto importante da epidemiologia, mas ainda pouco investigado no Brasil, é a caracterização dos diferentes sorotipos, ou genótipos, presentes no país. Conhecer as linhagens de *C. trachomatis* é um importante objetivo no campo da epidemiologia, bem como nas pesquisas básicas e clínicas para um melhor conhecimento desta infecção. A caracterização de linhagens de *C. trachomatis* pode fornecer informações valiosas relacionadas às variantes circulantes na comunidade. Com um melhor conhecimento da epidemiologia da infecção clamidial, esforços para prevenir o avanço desta doença serão, possivelmente, mais efetivos (Yu et al., 2007).

## **6. Microbiota vaginal**

A microbiologia do trato genital baixo da mulher é um conjunto dinâmico sendo exemplo complexo de colonização de diversas espécies microbianas em variadas quantidades onde a regulação não é totalmente compreendida (Larsen et al., 2001; Donders et al., 2002). Entretanto, sabe-se que em mulheres saudáveis o ecossistema vaginal é dominado por *Lactobacillus* spp. e que várias outras bactérias estão presentes em um pequeno número.

Os lactobacilos estão envolvidos na manutenção da microbiota vaginal normal impedindo a proliferação de microrganismos endógenos (bastonetes anaeróbios

Gram-negativos, *Mycoplasma genital* e *Gardnerella vaginalis*) e outros patógenos. Eles podem ativar o sistema imune, competir com outros microrganismos para a aderência do epitélio vaginal, e produzir ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (Vitali et al., 2007) os quais tornam o ambiente inóspito para muitas outras bactérias. Este ecossistema vaginal sofre mudanças em estrutura e composição sendo influenciada pela idade, menarca, gravidez, frequência de atividade sexual, uso de anticoncepcional, níveis hormonais, número de parceiros sexuais, assim como por vários hábitos e práticas como ducha vaginal e comportamento sexual (Zhou et al., 2004).

Em mulheres saudáveis, a comunidade vaginal é tipicamente dominada por várias espécies de lactobacilos com números de aproximadamente de  $10^8$  UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias por mL) na secreção vaginal. O restante da comunidade é composta por *Staphylococcus* coagulase negativa, *Streptococcus agalactiae* B e espécies de *Corynebacterium* spp., *Prevotella* spp., *G. vaginalis*, *Mycoplasma* spp. e bactérias entéricas variando na taxa de  $10^4$  a  $10^6$  (Coolen et al., 2005). A microbiota lactobacilar pode estar presente na vagina em quantidades e morfotipos diferentes, possuindo um papel importante na classificação da microbiota como normal ou alterada (Donders et al., 2007).

Estudos recentes indicam que os microrganismos componentes da microbiota vaginal humana possuem um papel importante na prevenção contra a colonização por organismos indesejáveis (Vitali et al., 2007), incluindo os responsáveis por vaginose bacteriana, infecções fúngicas, doenças sexualmente transmissíveis e infecções do trato urinário (Zhou et al., 2004; Coolen et al., 2005; Donders et al., 2007).

Vaginite é a causa mais comum de procura por atendimento médico por mulheres, com aproximadamente 10 milhões de consultas médicas por ano. Esta infecção apresenta várias causas tais como candidíase vulvovaginal, vaginose bacteriana, doenças sexualmente transmissíveis, vaginites atróficas, irritação química, vaginite alérgica e vaginite causada por corpos estranhos (Owen et al., 2004).

A prevalência de vaginose bacteriana varia de 5% a 40% (Hutchinson et al., 2007). Este quadro é caracterizado por um desequilíbrio na microbiota vaginal resultando em descarga vaginal com odor de peixe em mulheres na idade

reprodutiva (Bhalla et al., 2007). Neste quadro, há um decréscimo ou substituição de lactobacilos, normalmente predominantes na microbiota vaginal normal, e a proliferação de *G. vaginalis*, *M. hominis* (Wiesenfeld et al., 2003; Owen et al., 2004) e anaeróbios, incluindo *Mobiluncus*, *Bacteroides* e espécies de *Peptostreptococcus* (Owen et al., 2004; Hutchinson et al., 2007). Este quadro tem sido associado a parto prematuro, infecções pré e pós-parto, endometriose pós-parto. Este quadro tem sido também associado à infecção por outros agentes de DST como *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e HIV (Hutchinson et al., 2007). Seu papel em complicações da saúde genital feminina como doença inflamatória pélvica, obstrução da tuba uterina e infertilidade é ainda incerto (Bhalla et al., 2007).

Este desequilíbrio pode acontecer em mulheres sem qualquer sintomatologia, mas normalmente está associada a uma descarga de secreção vaginal (Reid et al., 2003) que apresenta odor de peixe (Donders et al., 2007), um pH acima de 4,5 e presença de “células chave” (*clue cells*). Este achado em microscopia a fresco e os demais citados sugerem seu diagnóstico (Donders et al., 2007). A presença de bastonete Gram-negativo ou bastonete Gram-variável e a ausência de lactobacilos na secreção vaginal após a coloração pelo Gram também é altamente sugestivo de vaginose bacteriana (Owen et al., 2004).

O papel ativo da microbiota vaginal normal na prevenção contra o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, é hoje um aspecto amplamente reconhecido nas diferentes etiologias de vaginites e infecções cérvico-vaginais. Estudos demonstraram, por ex., que mulheres apresentando uma microbiota vaginal com predominância de *Lactobacillus* spp. foram menos susceptíveis à infecção por *N. gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *C. trachomatis*, que mulheres com microbiota alterada (Wiesenfeld et al., 2003) Vírus Herpes Simplex 2 (HSV-2) e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Bhalla et al., 2007). Desta forma, o conhecimento sobre a composição da microbiota vaginal associada à infecção por diferentes agentes tem se mostrado de fundamental importância (Coolen et al., 2005) podendo vir a se constituir um campo amplo de estudo na busca de indicadores de alterações no trato genital.

## II- JUSTIFICATIVA

Atualmente, por estudos realizados em vários países sabe-se que *C. trachomatis* é um dos principais agentes responsáveis por doenças sexualmente transmissíveis. De acordo com a Organização Nacional de Saúde, estima-se que ocorram aproximadamente 92 milhões de novas infecções por *C. trachomatis* por ano no mundo, sendo a mais comum bactéria transmitida sexualmente.

As infecções por este patógeno podem apresentar um grande impacto principalmente na saúde reprodutiva das mulheres uma vez que está associada com doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, infertilidade e até infecções graves no neonato transmitido de modo vertical. No sexo masculino embora as infecções não tragam conseqüências graves não se pode deixar de realçar o papel importante na transmissão da doença e re-infecção de seu parceiro de sexo, se a mesma não é diagnosticada e tratada.

A infecção por *C. trachomatis* tem uma característica muito preocupante, pois uma grande porcentagem das pessoas infectadas não apresenta nenhuma manifestação clínica e carregam não somente seqüelas de longo prazo, mas também sustentam a transmissão dentro da comunidade.

Infelizmente no Brasil esta doença não é de notificação compulsória como EUA e Canadá. Desta forma os dados existentes são decorrentes de estudos isolados, na maioria dos casos, realizadas em clínicas de pré-natal em grupos de alto risco, como trabalhadores do sexo, e/ou em clínicas especializadas em DST. Entretanto, esses estudos apontam sempre a importância desta infecção silenciosa em nosso meio bem como a necessidade de se realizar outros estudos para uma determinação mais apurada de sua prevalência em nossa população. Isto permitirá, em um prazo mais longo, o conhecimento da prevalência desta infecção em nosso meio e as características de sua patogenicidade. Todos estes conhecimentos agregados são importantes para o estabelecimento adequado de medidas preventivas para a redução da morbidade causada por esta infecção em nossa população.

Em virtude da gravidade ocasionada pelas infecções por *C. trachomatis* é muito importante uma detecção precoce da infecção. Neste sentido a utilização de métodos sensíveis e específicos é fundamental. Atualmente, é consenso que os testes de amplificação do material genético da bactéria apresentam uma ótima

especificidade e sensibilidade. Em virtude disto, diferentes regiões do genoma da bactéria têm sido propostas como alvo nestas regiões, sempre com o objetivo de aumentar a sensibilidade destas reações. Neste trabalho vamos comparar um teste comercial para a detecção de *C. trachomatis* com dois testes de PCR, sendo um desenvolvido por nosso grupo e outro disponível na literatura. Paralelamente, serão também investigadas possíveis alterações na microbiota vaginal, relacionadas à infecção por *C. trachomatis*. Este trabalho irá também aumentar o conhecimento sobre a frequência deste microrganismo uma vez que a população a ser estudada difere da maioria descrita na literatura brasileira.

### III- OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Comparar uma metodologia comercial e dois testes de PCR para a detecção da infecção por *C. trachomatis* investigando, ainda, uma possível associação da infecção com alterações na microbiota genital de mulheres e a frequência de infecções por esta bactéria em uma população de homens e mulheres atendidos em um Laboratório particular de análises clínicas.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Comparar a eficiência de uma PCR *in house* com a PCR mais utilizada em trabalhos de pesquisa e um teste de imunofluorescência direta comercial no diagnóstico de *C. trachomatis*;
2. Determinar a frequência de infecções por *C. trachomatis* na população de homens e mulheres atendidos no Instituto Hermes Pardini, com pedidos médicos para a pesquisa da bactéria;
3. Avaliar a microbiota vaginal de mulheres portadoras ou não de infecção por *C. trachomatis*, assim como o número de leucócitos polimorfonucleares em espécimes clínicos de indivíduos infectados ou não pela bactéria.
4. Com base em questionário aplicado, investigar sintomatologia, utilização de contraceptivos, faixa etária, estado civil e participação em plano de saúde, comparando portadores e não portadores da infecção por *C. trachomatis*.

## IV. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. População estudada

Foram candidatos a participar deste estudo homens e mulheres que buscaram a realização do teste de imunofluorescência direta para *C. trachomatis* em seus espécimes clínicos nas unidades do Instituto Hermes Pardini, no período de outubro de 2007 a Setembro de 2008.

Os pacientes foram esclarecidos sobre a pesquisa e, após assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexo 1**), foram submetidos a um questionário (**Anexos 2 e 3**) e encaminhados para a coleta de amostra clínica pelos funcionários do Instituto Hermes Pardini.

A participação não foi remunerada e nenhum voluntário desistiu de participar do projeto durante o desenvolvimento da pesquisa. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade Federal de Minas Gerais, parecer n<sup>o</sup> ETIC 004/06 (**Anexo 4**).

#### 4.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

##### Critérios de inclusão

- ❖ Homens e mulheres maiores de idade, sexualmente ativos, ou que já tenham tido relação sexual, e que procuraram o Instituto Hermes Pardini para realizar teste de imunofluorescência direta para *C. trachomatis*.
- ❖ Homens e mulheres que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

##### Critérios de exclusão

- ❖ Homens e mulheres com idade inferior a 18 anos.
- ❖ Homens e mulheres em uso de antibióticos sistêmicos, ou qualquer medicação genital, ou que tenham terminado os mesmos há menos de quinze dias antes da coleta.
- ❖ Homens e mulheres que tenham mantido relação sexual nas 24 horas que antecederam a coleta das amostras
- ❖ Mulheres menstruadas, no dia da coleta, ou que tenham realizado ducha vaginal ou exame ginecológico nas 24 horas que antecederam a coleta endocervical.

## **4.2. Coleta do espécime clínico**

### **4.2.1. Amostras clínicas de homens**

As coletas uretrais de homens foram realizadas antes da 1<sup>o</sup> urina do dia ou após sua retenção por 4 horas com auxílio de um *swab* de algodão. De cada homem foram coletadas duas amostras.

A primeira amostra coletada foi utilizada para a confecção de esfregaços em duas lâminas, um deles fixado com metanol para a realização de imunofluorescência direta e o outro fixado pelo calor em bico de Busen, para posterior coloração pelo método de Gram.

A segunda amostra coletada foi utilizada para realização de testes de PCR. Com este objetivo, após a sua coleta, a amostra foi armazenada em meio de transporte (Dulbecco's, INLAB) e mantida a -20° C até o preparo da amostra para a realização do teste de PCR.

### **4.2.2. Amostras clínicas de mulheres**

Após a localização do material endocervical, a coleta foi realizada com a introdução de um espéculo vaginal estéril, sem a utilização de lubrificantes. O muco cervical quando presente e em excesso, foi removido com gaze estéril sustentado com uma pinça Cherron também estéril.

Uma primeira coleta foi realizada com uma *swab* de algodão introduzida no endocérvice, seguido de movimentos rotatórios, visando à obtenção da maior quantidade possível de células. Em seguida foi confeccionado um esfregaço em lâmina, fixada com metanol para realização de imunofluorescência direta.

Uma segunda coleta foi realizada pela introdução de uma escova cervical por 1-1,5 cm adentro do canal endocervical, seguida de movimentos circulares, visando à obtenção da maior quantidade possível de células. A amostra coletada por esta técnica foi armazenada em meio de transporte, e mantida a -20°C até a realização da PCR.

Um *swab* vaginal também foi utilizado para a coleta de material das paredes vaginais e para a confecção de lâmina a ser corada pelo método de Gram.



### 4.3. Coloração pelo método de Gram

Após a coleta com *swab*, as secreções uretrais e vaginais foram espalhadas em círculos na superfície de uma lâmina que foi fixada pelo calor pela passagem da mesma sobre a chama por, pelo menos, três vezes. A seguir foi realizada a coloração de Gram, como já está bem estabelecida na literatura.

Nas amostras biológicas de secreção vaginal coradas pelo Gram foi avaliada a composição de acordo com o critério de Grade simplificado de amostra vaginal validado por Ison et al. (2002) que, após a avaliação de toda a população bacteriana presente na microbiota vaginal, realiza uma subdivisão em Grades de 0 a 4.

- ❖ Grade 0: presença de células epiteliais e ausência de bactérias.
- ❖ Grade I (Microbiota normal): Presença de apenas morfotipos de lactobacilos.
- ❖ Grade II (Microbiota intermediária): Decréscimo de lactobacilos e presença de outras bactérias.
- ❖ Grade III (Microbiota alterada): Ausência de lactobacilos e presença de outros morfotipos de bactérias.
- ❖ Grade IV: Presença de células epiteliais e somente cocos Gram positivos.

Além disso, foi também avaliado o número de piócitos nos espécimes vaginais. O espécime uretral do sexo masculino foi observado além da presença de piócitos a presença de diplococos Gram-negativos, indicadores de infecção por *Neisseria gonorrhoeae*, outro agente de uretrites.

### 4.4. Pesquisa de *C. trachomatis* por imunofluorescência direta

A detecção de *C. trachomatis* foi realizada pelo *Kit* CHLAMYDIA DFA (*Omega Diagnostics*, Scotland, United Kingdom. Importado e distribuído por BioSys LTDA). O *kit* possui um anticorpo monoclonal específico para a principal proteína da membrana externa da bactéria (MOMP), conjugado com fluoresceína. Seguindo a metodologia descrita no *kit*, o anticorpo é adicionado à lâmina contendo a amostra biológica e posteriormente é analisado ao microscópio de fluorescência. Por esta técnica, o anticorpo permanece por 30 minutos, em câmara úmida, a 37°C, para a sua ligação à proteína, antigênica, do microrganismo quando, então, a lâmina é

lavada em tampão fosfato (PBS). Após a secagem da lâmina é adicionada uma gota de líquido de montagem e posteriormente uma lamínula é colocada sobre o material, com o cuidado de se evitar a formação de bolhas. As lâminas são examinadas utilizando-se um microscópio de fluorescência (*Nikon Eclipse E 200*) em um aumento de 400 X. A *C. trachomatis* exibe uma fluorescência brilhante verde-maça dos elementos extracelulares ou corpos reticulares que contrastam com o material marrom avermelhado. Um diagnóstico positivo pode ser feito quando as amostras biológicas exibem no mínimo 10 corpos elementares e/ou reticulares.

#### **4.5. Preparo dos espécimes clínicos para os testes moleculares**

Os espécimes coletados utilizadas nos testes moleculares foram, inicialmente, submetidos a um processo de lise. A amostra coletada em meio de transporte (Dulbecco's) foi homogeneizada com o auxílio de um agitador (AP 56, *Phoenix*) e centrifugada a 13.000 g, por 30 min, à temperatura ambiente, em microcentrifuga (BR4i, Jouan, França). O sedimento obtido foi diluído em 250 µL de Tris-HCl 10 mM contendo Proteinase K (0,5 mg/mL) (Sigma), incubado em banho-maria inicialmente a 55°C por 1 h para a ação da enzima, e a seguir por 10 min a 95°C, em banho seco (*Fisher Scientific*), para sua inativação.

##### **4.5.1. Purificação do DNA das amostras clínicas após o processo de lise**

Para diminuir a presença de inibidores e, conseqüentemente, aumentar a sensibilidade da reação, a purificação do DNA foi realizada pela adição de 100 µL de isopropanol (Merck) a 100 µL do material lisado. Após uma centrifugação a 10.000 g (BR4i) por 15 min, e descarte do sobrenadante, o sedimento foi lavado com etanol (80-95%) e novamente centrifugado a 10.000 g por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o DNA foi invertido para a evaporação do etanol. O DNA foi, então, diluído em 20 µL de H<sub>2</sub>O Mili-Q estéril.

#### 4.5.2. Amplificação do gene da $\beta$ globina

Para se verificar a presença e qualidade do DNA após sua purificação a partir das amostras clínicas, foi realizada, inicialmente, a amplificação do gene da  $\beta$ -globina. O resultado esperado com a utilização dos iniciadores descritos na **Tabela 01** é a amplificação de um fragmento de 209 pares de bases (Lan et al., 1995; Singh et al., 2003).

**Tabela 1 - Seqüência dos iniciadores para a amplificação de uma região do gene da  $\beta$ -globina e tamanho do fragmento amplificado**

Tamanho do fragmento	Seqüência do iniciador senso	Seqüência do iniciador anti-senso
209 pb <sup>1</sup>	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	GAA ACC CAA GAG TCT TCT CT

1-GenBank Acession – NG000007

Para a PCR, foram utilizados 200  $\mu$ M de cada desoxinucleotídeo tri-fosfato (dATP, dCTP, dTTP e dGTP, GibcoBRL), 10 pmol de cada iniciador (Invitrogen), 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e tampão de enzima concentrado (Invitrogen) em um volume final de 20  $\mu$ L. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, USA) seguindo um programa composto de desnaturação a 94°C por 10 min, e 40 ciclos de amplificação consistindo de 30 seg, a 94°C, 30 seg a 55°C e 1 min e 30 seg a 72°C, e finalizando com outros 7 min a 72°C.

Os produtos da amplificação foram analisados após eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio (Promega) incorporado, para visualização das bandas. A eletroforese foi realizada a 100 V, utilizando tampão TBE (89 mM TRIS-Borato, 2 mM EDTA, pH 8,2) por cerca de 40 min (Biorad, fonte *Power Pac 300*, BioRad). O tamanho do fragmento foi estimado pela comparação com o marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

#### 4.6. PCR para o plasmídio críptico *C. trachomatis*

##### 4.6.1. PCR utilizando os iniciadores HL1 e HL2

Com as amostras consideradas positivas e negativas para o gene da  $\beta$ -globina foi realizado um teste de PCR para a pesquisa da bactéria utilizando os iniciadores HL1 e HL2 estabelecidos por nosso grupo e já publicados na literatura (Lima *et al.*, 2007) que amplificam uma região de 512 pb do plasmídio críptico (**Tabela 2**).

**Tabela 2. Sequência dos iniciadores (HL1 /HL2) para a amplificação de uma região do gene do plasmídio críptico e tamanho do fragmento.**

Iniciador/Tamanho do fragmento amplificado	Iniciador senso	Iniciador anti-senso
H1/H2 (512 pb) <sup>1</sup>	TAG AGA TAG GAA ACC AAC TC	CTC GGG TTA ATG TTG CAT GA

1-GenBank Acession – CP000052

A PCR foi realizada com 200  $\mu$ M de cada desoxinucleotídeo tri-fosfato (dATP, dCTP, dTTP e dGTP, GibcoBRL), 10 pmol de cada iniciador (Invitrogen), 2,5 mM de  $MgCl_2$ , 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e tampão de enzima concentrado (Invitrogen) em um volume final de 20  $\mu$ L. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, MA, USA), seguindo um programa consistindo de desnaturação a 95°C, por 5 min, seguida de 40 ciclos de amplificação de 30 seg a 95°C, 30 seg a 55°C e 1 min e 30 seg a 72°C, e finalizando com outros 7 min, a 72°C.

##### 4.6.2. PCR utilizando os iniciadores KL1 e KL2

Para todas as amostras coletadas no período de outubro de 2007 a Julho de 2008, foram também realizados ensaios de PCR com iniciadores descritos na literatura (KL1/KL2) (Mahony *et al.* 1992) que apresentam como produto final a amplificação de um fragmento de 241 pb (**Tabela 3**) do plasmídio críptico.

**Tabela 3. Sequência dos iniciadores para amplificação (KL1/KL2) de uma região do plasmídeo críptico e tamanho do fragmento amplificado.**

Iniciador/Tamanho do fragmento amplificado	Iniciador senso	Iniciador anti-senso
KL1/KL2 – (241 pb) <sup>1</sup>	TCC GGA GCG AGT TAC GAA GA	AAT CAA TGC CCG GGA TTG GT

<sup>1</sup>GenBank Acession # – CP000052

A PCR consistiu de 200 µM de cada desoxinucleotídeo tri-fosfato (dATP, dCTP, dTTP e dGTP, GibcoBRL), 10 pmol de cada iniciador (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e tampão de enzima concentrado (Invitrogen) em um volume final de 20 µl. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador (PTC-100, MJ Research, MA, USA), seguindo um programa consistindo de desnaturação a 94°C, por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificação de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C, e finalizando com outros 7 min, a 72°C.

#### 4.6.3. Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos pelos dois testes foram analisados após a corrida do produto de amplificação em gel de poliacrilamida 6%. A eletroforese foi realizada a 150 V, utilizando tampão TBE (89 mM Tris-Borato; 2 mM EDTA; pH 8,2), por cerca de 2 horas (BioRad, Power Pac 300, Biorad).

Para a coloração pela prata o gel foi, inicialmente, coberto por uma solução fixadora (etanol 10% e ácido acético 5%) por, no mínimo, 20 min. Após ser lavado, o gel foi incubado em solução de prata 0,2% por 10 min. Após a retirada da solução da prata, foi feita a lavagem com água Milli-Q e a solução reveladora (NaOH 2% e formaldeído 0,5%) foi, então, adicionada. O gel foi cuidadosamente agitado até o aparecimento das bandas. A reação de revelação foi interrompida pela adição de solução de etanol 10% e ácido acético.

#### 4.7. Nested-PCR para a amplificação do gene *omp1* de *C. trachomatis*

Os espécimes positivos para a pesquisa de *C. trachomatis* pelo método de imunofluorescência direta e negativas para ambos os métodos moleculares descritos

anteriormente, foram submetidos à amplificação do gene *omp1* por *Nested-PCR* para se verificar a presença de bactérias defectivas para o plasmídeo críptico ou a detecção falso positivo.

O par de iniciadores externos utilizados está descrito na literatura (Jurstrand et al. 2001) e o par de iniciadores internos foi construído em nosso laboratório (Lima et al., 2007). As seqüências dos dois pares de iniciadores e o tamanho do fragmento amplificado são mostradas na **Tabela 4**.

**Tabela 4. Seqüências dos iniciadores para a amplificação de uma região do gene *omp1* e tamanho do fragmento amplificado.**

Iniciador - Tamanho do fragmento amplificado	Iniciador senso	Iniciador anti-senso
SERO1A/OMP2 – (1127pb) <sup>1,2</sup>	ATG AAA AAA CTC TTG AAA TCG G	ACT GTA ACT GCG TAT TTG TC
JP1/JP2 – (1015 pb) <sup>1*</sup>	CCT TGC AAG CTC TGC CTG TG	GAT TTT CTA GAT TTC ATC TTG TTC

<sup>1</sup>GenBank Acession # – AF304858

<sup>2</sup>Jurstrand et al., 2001

<sup>1\*</sup>Nested PCR

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 µl, contendo 10 pmol de cada iniciador (Invitrogen), 200 mM de dNTPs (Invitrogen), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 1,5 unidades da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen) e tampão da enzima concentrado (Invitrogen), em termociclador (PTC-100, MJ Research, MA, USA). O programa utilizado para a PCR externa consistiu de desnaturação a 94°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de amplificação de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e finalizando com 7 min a 72°C. Para a *Nested-PCR* a reação de amplificação foi realizada como a PCR externa com exceção da concentração de MgCl<sub>2</sub> modificada para 2,5 mM. O programa consistiu de 5 min a 94°C seguidos de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 45°C e 1 min a 72°C, com um passo final de 10 min a 72°C.

#### 4.7.1. Análise dos produtos de PCR

Os produtos de PCR obtidos foram analisados após eletroforese em gel de poliacrilamida 6% corado pela prata como descrito anteriormente. O tamanho do fragmento foi estimado pela comparação com o marcador de peso molecular de 100 pb.

## 5. Determinação da sensibilidade e especificidade das PCR para detecção do plasmídeo críptico

Segundo Fletcher et al (1991), a **Sensibilidade** de um teste é a capacidade em reconhecer os indivíduos verdadeiros positivos em relação ao total de doentes. Assim, a sensibilidade avalia a capacidade do teste de detectar a doença quando ela realmente está presente. **Especificidade** é o poder que o teste possui de distinguir os verdadeiros negativos em relação ao total de doentes, isto é, avalia a capacidade do teste afastar a hipótese da doença quando ela está realmente ausente(**Tabela 5**).

**Tabela 5. Avaliação da validade de um teste diagnóstico.**

Resultado do Teste	Doença	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiro Positivo (A)	Falso Positivo (B)
Negativo	Falso negativo (C)	Verdadeiro Negativo (D)

De acordo com o quadro acima, temos que, algebricamente:

Sensibilidade:  $A/A+C$

Especificidade:  $D/B+D$

**Valor preditivo positivo (VPP):** é a probabilidade de um caso identificado com um determinado teste ser de fato positivo. O Valor Preditivo Positivo (VPP) expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença.

Algebricamente temos:  $VPP = A / A + B$

**Valor preditivo negativo (VPN):** é a probabilidade de um resultado negativo obtido por um determinado teste ser de fato negativo, ou seja, o Valor Preditivo Negativo (VPN) expressa a probabilidade de um paciente com o teste negativo não ter a doença.

Algebricamente temos:  $VPN = D / C + D$

### **5.1- Análises dos resultados e estatística**

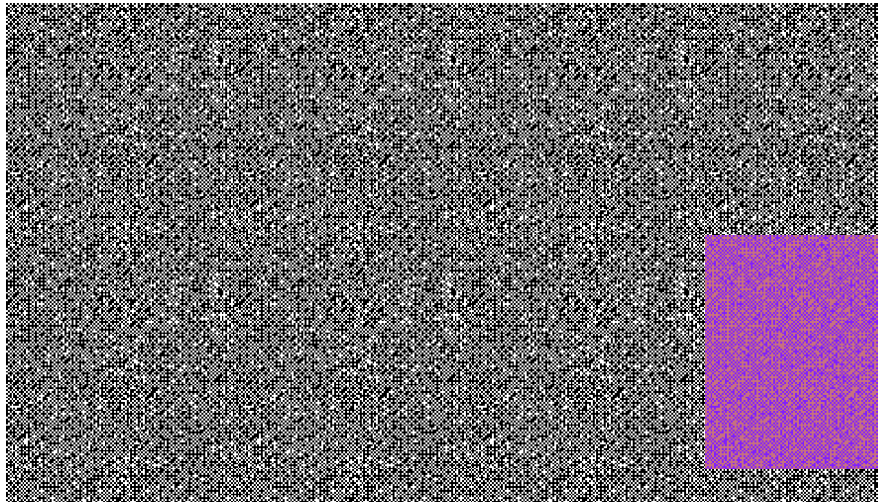
Os dados obtidos sobre a investigação da presença da infecção pela técnica de PCR e por imunofluorescência direta e juntamente com os dados clínicos dos envolvidos no estudo foram analisados pelo programa Epi Info (versão 3.4.3). Os resultados dos testes de PCR utilizados foram analisados por meio de teste de Fisher, considerando-se as diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .



## V- Resultados

### 5.1- Coleta da população estudada

No período de Outubro de 2007 a Setembro de 2008, todos os homens e mulheres, que buscaram a pesquisa para *Chlamydia trachomatis* pelo método de imunofluorescência direta em seus espécimes clínicos uretrais e cervicais, nas unidades do Instituto Hermes Pardini, foram convidados a participar deste projeto. No decorrer destes 12 meses (**Figura 4**), 169 indivíduos aceitaram gentilmente a participação neste estudo.



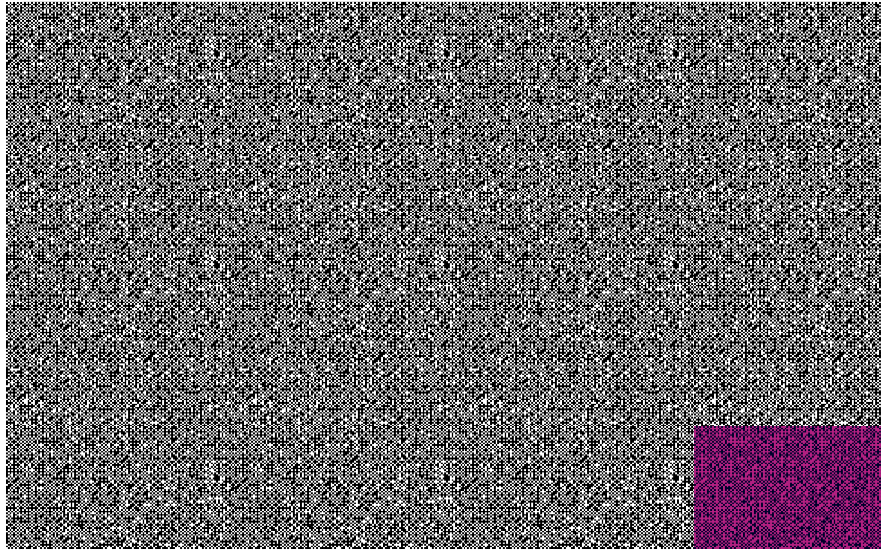
**Figura 4. Número e sexo de pessoas que aceitaram participar deste estudo no decorrer do período de Outubro de 2007 a Setembro de 2008.** Estas pessoas assinaram um termo de consentimento e responderam a um questionário, previamente aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG.

As coletas do material biológico de homens e mulheres envolvidos no estudo foram realizadas em dezesseis unidades do Instituto Hermes Pardini localizadas em diferentes bairros da capital mineira com números de amostras coletadas muito diversificadas variando de uma a 32 coletas.

No grupo de pessoas participantes do estudo a grande maioria (63,3%; n=107) declarou ser residente em Belo Horizonte enquanto 36,7% (n=62) responderam residir na grande BH ou em cidades próximas à grande BH. Sendo Contagem, com 33 participantes (19,5%), o município com a maior representação (dados não mostrados).

### 5.1.1 - Características da população estudada

No grupo das 169 pessoas participantes do estudo encontramos 45,6% indivíduos (n=77) do sexo masculino e 54,4% (n=92) do sexo feminino (**Figura 5**). (p>0,05)



**Figura 5. População de homens e mulheres que buscaram a pesquisa de *C. trachomatis* pelo método de imunofluorescência direta nas unidades do Instituto Hermes Pardini e aderiram ao estudo.** A população masculina foi avaliada pelo exame de material uretral e as mulheres após coleta de material cervical. Os espécimes clínicos foram obtidos pela inserção de uma escova, própria para a coleta, no canal uretral dos homens e no canal endocervical das mulheres. Nas duas situações o material coletado foi depositado em meio de transporte e armazenado a -20° C até a realização dos testes.

## 6. Pesquisa da infecção por *C. trachomatis* por diferentes testes diagnósticos

Foram utilizados dois testes de PCR e o teste de Imunofluorescência direta. Para os testes de amplificação do material genético da bactéria, foi realizado, inicialmente, um teste para se verificar a qualidade do DNA purificado.

### 6.1 - Pesquisa do gene da $\beta$ -globina

Todos os 169 espécimes clínicos obtidos, representados por amostras uretrais e cervicais de homens e mulheres respectivamente, foram submetidos à PCR para amplificação de um fragmento do gene da  $\beta$ -globina, com o objetivo de avaliar a qualidade do DNA presente na amostra bem como verificar a presença de inibidores.

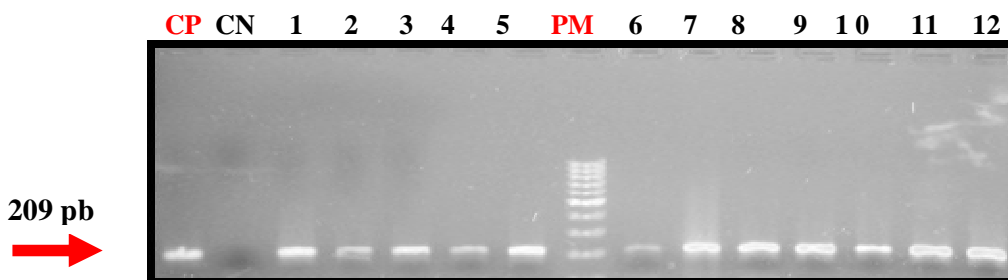
A maioria dos espécimes clínicos 152 (89,9%) amplificou o fragmento de 209 pb do gene da  $\beta$ -globina (**Figura 6**). Oito espécimes (4,7%) amplificaram tal fragmento após uma diluição de 1:3 em H<sub>2</sub>O milliQ e três amostras (1,8%) amplificaram após a diluição de 1:4. A diluição minimiza a ação dos inibidores permitindo que a amplificação aconteça. No entanto, em seis espécimes clínicos (3,6%) não se obteve a amplificação do fragmento do gene da  $\beta$ -globina, mesmo após esta última diluição. Diluições maiores não foram testadas.

Desta forma, das 169 amostras coletadas 163 (96,4%) mostraram-se adequadas para a amplificação de material genético e 6 (3,6%) estavam inadequadas. A pesquisa da infecção por *C. trachomatis*, no entanto, foi realizada nos 169 espécimes clínicos coletados, pois foram também utilizados para a pesquisa pelo teste por imunofluorescência.

## 6.2 - Pesquisa de *C. trachomatis* pela amplificação de material genético

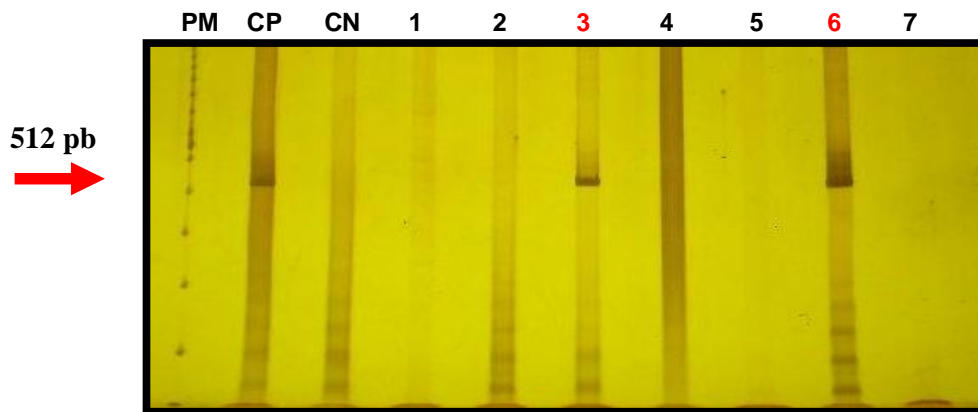
### 6.2.1. PCR utilizando os iniciadores HL1 e HL2

Dos 169 espécimes analisados no estudo, 24 (14,2%) foram positivas na PCR *in house* que utiliza os iniciadores HL1 e HL2 e amplifica um fragmento de 512 pb do plasmídeo críptico da bactéria (**Figuras 7 e 10 e Tabela 6**). Destes, 21 espécimes (87,5%) eram do sexo masculino e três (12,5%) do sexo feminino.



**Figura 6. Pesquisa do fragmento do gene da  $\beta$ -globina nos espécimes clínicos.** Perfil eletroforético em gel de agarose 1,5%, incorporado com brometo de etídio, evidenciando uma banda de 209 pb, correspondente à amplificação de um fragmento do gene da  $\beta$ -globina nos espécimes

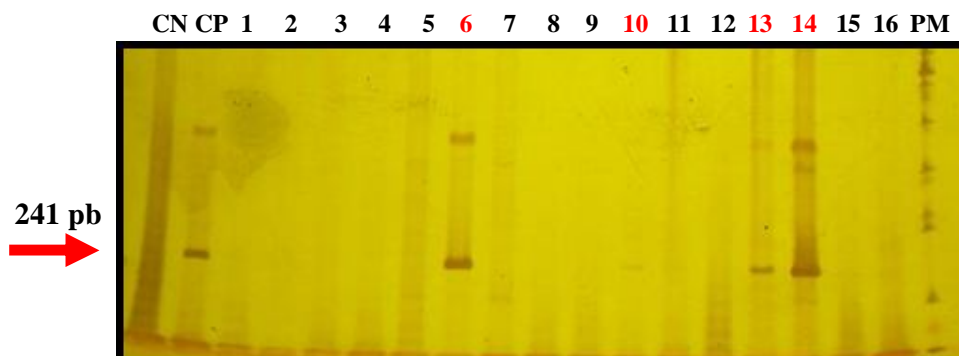
clínicos. CN: Controle Negativo; CP: Controle positivo; PM: Padrão de peso molecular (100 pb *Ladder*, Invitrogen). Os números de 1 a 12 representam espécimes clínicos. Esta figura é representativa das 169 amostras clínicas testadas.



**Figura 7. Detecção da infecção por *C. trachomatis* pela amplificação de um fragmento de 512 pb do plasmídio críptico da bactéria.** As amostras clínicas foram coletadas pela inserção de uma escova no canal uretral dos homens e endocervical das mulheres e mantidas em meio de transporte a -20°C. Um volume de 2 µL do DNA purificado foi utilizado em 20 µL da reação de PCR com os iniciadores HL1 e HL2. O material amplificado foi analisado em gel de poliacrilamida 6% posteriormente analisado após coloração pela prata. PM: Padrão de peso molecular (100 pb *Ladder*, Invitrogen); CP: Controle positivo; CN: Controle negativo. Os números apresentados em vermelho indicam espécimes clínicos positivos para *C. trachomatis*. Esta figura é representativa das 169 amostras clínicas testadas.

### 6.2.2 - PCR utilizando os iniciadores KL1 e KL2

Com o objetivo de comparar a sensibilidade dos iniciadores HL1 e HL2 com iniciadores já descritos na literatura para a detecção da infecção por *C. trachomatis*, as 169 amostras clínicas foram analisadas por outra PCR, também voltada para o plasmídio críptico, na qual foram utilizados os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241 pb. Nesta reação foram detectados 30 espécimes positivos (17,7%) (**Figuras 8 e 10 e Tabela 6**), sendo que, destes, 25 (83,3%) eram amostras do sexo masculino e cinco (16,7%) do sexo feminino.

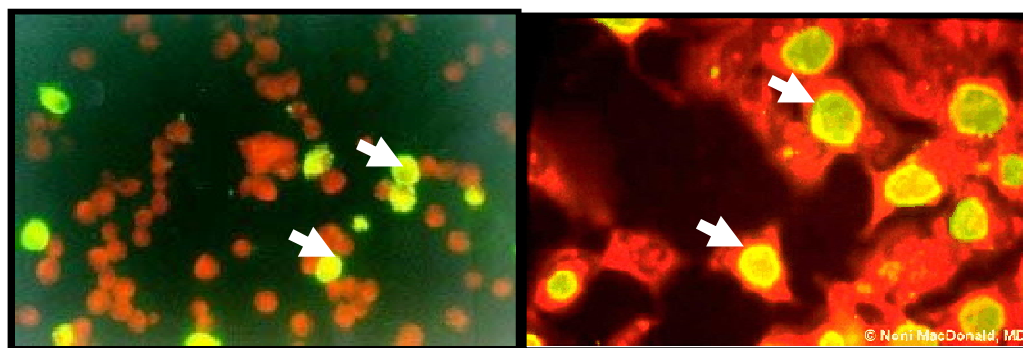


**Figura 8. Detecção da infecção por *C. trachomatis* pela amplificação de um fragmento de 241 pb do plasmídio críptico da bactéria.** As amostras clínicas foram coletadas pela inserção de uma escova no canal uretral dos homens e endocervical das mulheres e mantidas em meio de transporte a -20°C. Um volume de 2 µL do DNA extraído e purificado foi utilizado em 20 µL da reação de PCR com os iniciadores KL1 e KL2. O material amplificado foi analisado em gel de poliacrilamida 6% posteriormente analisado após coloração pela prata. PM: Padrão de peso molecular (100 pb Ladder, Invitrogen); CP: Controle positivo; CN: Controle negativo. Os números apresentados em vermelho indicam espécimes clínicos positivos para *C. trachomatis*. Esta figura é representativa das 169 amostras clínicas testadas.

### 6.3 - Pesquisa de *C. trachomatis* por imunofluorescência direta

O teste de imunofluorescência direta para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* é rotineiramente realizado no Instituto Hermes Pardini. Desta forma, este teste foi utilizado como um terceiro parâmetro no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*. Os resultados obtidos nas duas reações de amplificação do material genético da bactéria puderam, assim, ser comparados com um teste comercial utilizado para o diagnóstico da infecção por laboratórios comerciais.

Na imunofluorescência direta são utilizados anticorpos monoclonais direcionados à principal proteína de membrana externa (MOMP) de *C. trachomatis*. Das 169 amostras avaliadas, 23 (13,6%) foram positivos para a infecção (**Figuras 9 e 10 e Tabela 6**), sendo 14 (60,9%) do sexo masculino e nove (39,1%) do sexo feminino.



**Figura 9. Detecção da infecção por *C. trachomatis* pelo método de imunofluorescência direta.** As setas indicam a fluorescência que determina a ligação do anticorpo monoclonal conjugado com

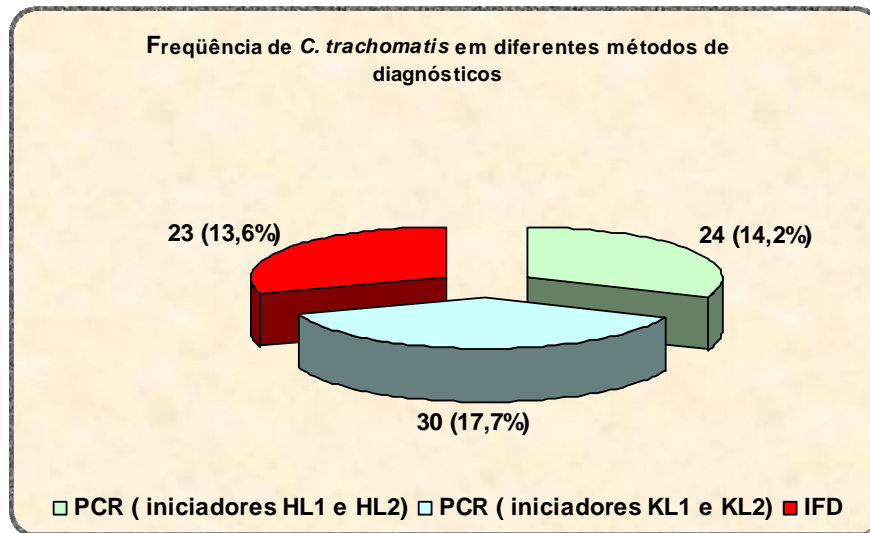
fluoresceína à epitopos do antígeno presente em corpos e retículos elementares da bactéria presentes nos espécimes clínicos. Esta figura é representativa das 169 amostras clínicas testadas.

## **7 - Avaliação dos métodos utilizados**

Comparando os três métodos em estudo, observou-se uma concordância de 139 (82,2%) nos resultados dos testes utilizados para a pesquisa da infecção por *C. trachomatis* nos espécimes clínicos avaliados. Destes, 10 (5,9%) foram positivos e 129 (76,3%) foram negativos pelos três métodos analisados. Um número de 10 (5,9%) foi positivo somente pelo método de imunofluorescência direta e 14 (8,3%) apenas pelos dois métodos moleculares utilizados (HL1/HL2 e KL1/KL2). Um número de três (1,8%) foi positivo unicamente pelos iniciadores KL1/KL2 e três (1,8%) foram positivos pelos métodos de IFD e KL1/KL2. Não foram detectados espécimes clínicos positivos para os iniciadores HL1/HL2 e negativo para KL1/KL2 (**Tabela 6**). Os resultados entre as PCR HL1/HL2 e KL1/KL2 foram estatisticamente diferentes pelo teste exato de Fisher ( $p < 0,5$ ).

### **7.1-Determinação da sensibilidade e especificidade das PCR *in house***

Os resultados encontrados para nos testes de PCR foram analisados quanto à especificidade e sensibilidade considerando o teste de imunofluorescência direta como padrão-ouro. Seguindo a fórmula apresentada em materiais e métodos a PCR-HL1/HL2 mostrou sensibilidade de 43% e especificidade de 91%. A PCR-KL1/KL2 apresentou sensibilidade de 57% e especificidade de 88%. Foram calculados também o Valor Preditivo Positivo (VPP) e Preditivo Negativo (VPN). A PCR-HL1/HL2 apresentou VPP de 42,0%, e o VPN de 91%. Para a PCR-KL1/KL2 o valor VPP foi de 43% e VPN de 93%. Considerando a PCR KL1/KL2 o padrão ouro, os iniciadores HL1/HL2 demonstraram a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 80%, 100%, 100%, e 96%, respectivamente e 100%, 96%, 80% e 100%, respectivamente, para KL1/KL2 considerando a PCR HL1/HL2 o padrão ouro.



**Figura 10.** Freqüência da infecção por *C. trachomatis* detectada pela utilização de três métodos de diagnóstico. Os testes foram utilizados para avaliar amostras uretrais masculinas e endocervicais femininas em uma população de 169 indivíduos que procuraram o Instituto Hermes Pardini para a realização da pesquisa de infecção por *C. trachomatis*. Os testes foram realizados após o consentimento por escrito de todos os indivíduos. PCR: Reação em cadeia da polimerase; IFD: Imunofluorescência direta

<i>IFD</i>	PCR- plasmídeo HL1/HL2	PCR- plasmídeo KL1/KL2	TOTAL			
			Amostras masculinas	Amostras femininas	Nº Absoluto	%
+	+	+	8	2	10	5,9
-	-	-	49	80	129	76,3
+	-	-	3	7	10	5,9
-	+	+	13	1	14	8,3
-	-	+	1	2	3	1,8
+	-	+	3	0	3	1,8
<b>TOTAL</b>		<b>77</b>		92	169	100

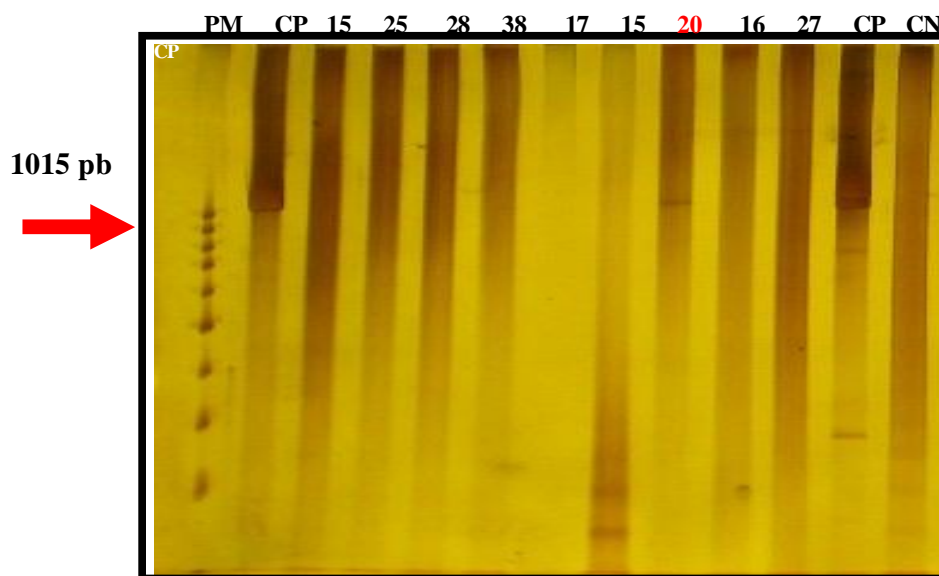
**Tabela 6.** Comparação dos três métodos de diagnóstico utilizados para a pesquisa da infecção por *C. trachomatis*. Foram analisadas amostras uretrais masculinas e cervicais de mulheres que buscaram atendimento no Instituto Hermes Pardini e consentiram em participar deste estudo. +: Positivo;- Negativo; IFD: Imunofluorescência direta; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase.

## 8 - Pesquisa para *C. trachomatis* por *Nested-PCR*

Com o objetivo de se detectar linhagens de *C. trachomatis* defectivas para o plasmídio, foi realizada uma *Nested-PCR* para a amplificação de um fragmento de 1015 pb do gene *omp1*, que codifica a principal proteína de membrana externa (MOMP) da bactéria. Das 10 amostras positivas pela imunofluorescência direta e negativas pelos dois testes moleculares, apenas uma amostra (10%) apresentou a amplificação desta região do gene *omp1*, sendo, portanto, positiva para a infecção por *C. trachomatis* após a *Nested-PCR* (**Figura 11**).

## 9 - Frequência de *C. trachomatis* na população avaliada

Os espécimes biológicos de homens e mulheres envolvidos no estudo foram considerados verdadeiros positivos para pesquisa *C. trachomatis* quando pelo menos dois dos três testes avaliados foram positivos. Desta forma, a frequência de *C. trachomatis* na população em estudo foi 16,6%, sendo 31,2% (n=24) para o sexo masculino foi e 4,3% (n=4) para o feminino (**Figura 12**).



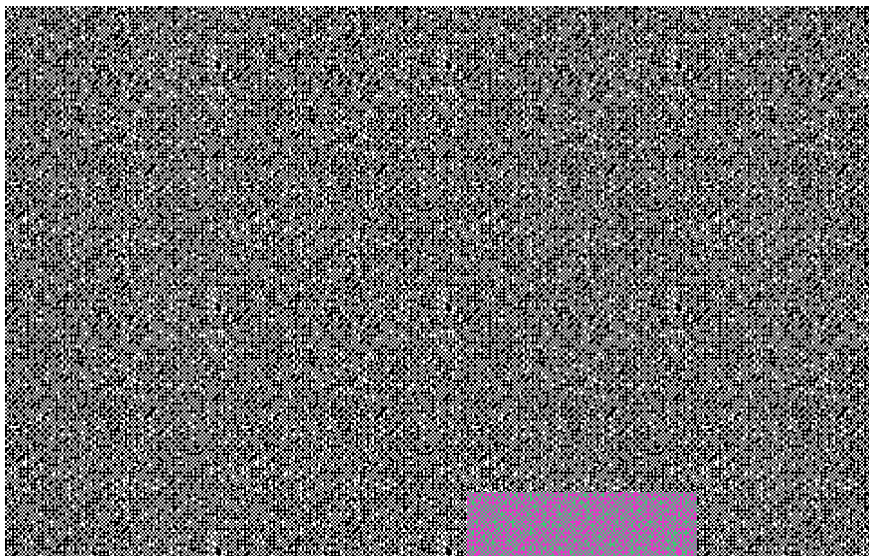
**Figura 11. Detecção da infecção por *C. trachomatis* por *Nested-PCR* para a amplificação de um fragmento de 1015 pb do gene *omp1* da bactéria.** As amostras positivas para a pesquisa da infecção por *C. trachomatis* pelo método da imunofluorescência direta e negativas para as PCR foram submetidas à *Nested-PCR*. Para a primeira PCR foi utilizado iniciadores externos que amplificam um fragmento 1127 pb. Posteriormente este produto amplificado foi submetido a uma nova reação da cadeia da polimerase que utilizou iniciadores internos que amplificam um fragmento de 1115 pb. Os mesmos posteriormente foram corridos em gel de poliacrilamida 6%, corado com Nitrato de prata



evidenciando uma banda de 1015 pb. PM: Padrão de peso molecular (100 pb *Ladder*, Invitrogen); CP: Controle Positivo, CN: Controle negativo. Os números de cor preta representam amostras clínicas negativas, e em vermelha amostra positiva para *C. trachomatis*.

## 10 -Avaliação da microbiota genital na população feminina participante do estudo

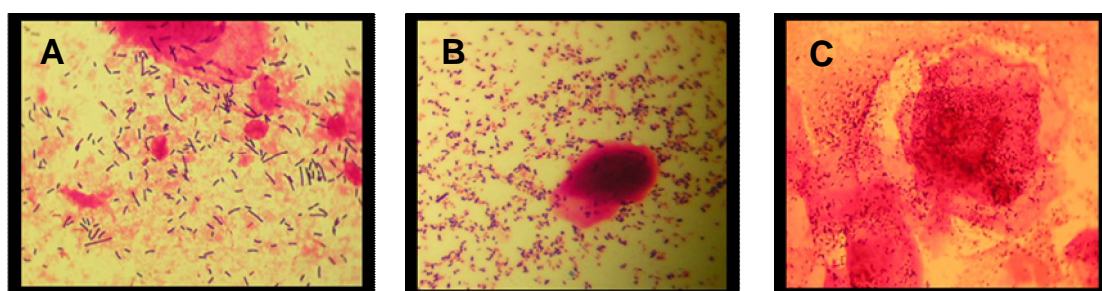
A microbiota genital das mulheres envolvidas no estudo foi também avaliada com o objetivo de se detectar qualquer alteração relacionada à infecção por *C. trachomatis*. Após a coloração pelo método de Gram observou-se que 68,5% (n=63) das mulheres participantes do estudo apresentaram características da Grade I (microbiota normal) (**Figuras 13A**), 14,1% (n = 13) da Grade II (microbiota intermediária) (**Figuras 13B**), e 17,4% (n = 16) da Grade III (microbiota alterada) (**Figuras 13C**) (**Figura 14**). Não foi observado grades 0 e IV nesta população. A população de homens não foi realizada avaliação da microbiota uma vez que a uretra é isento de microorganismos residentes.



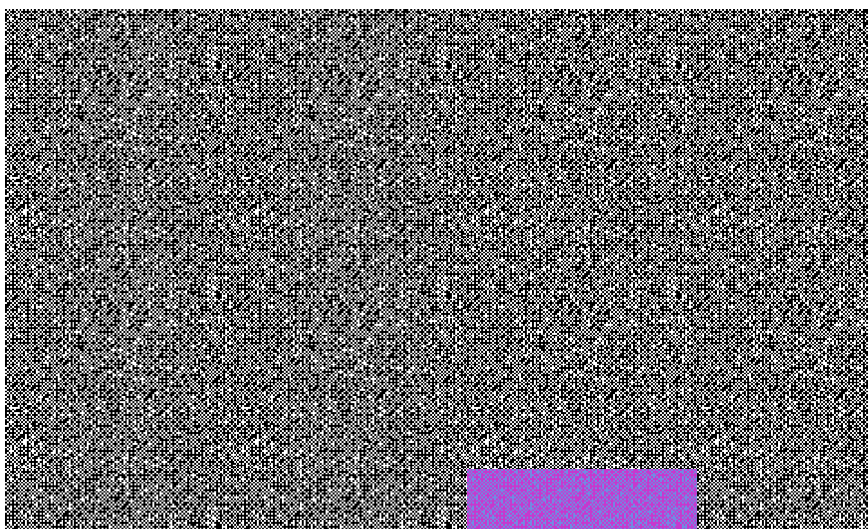
**Figura 12. Frequência de *C. trachomatis* nos indivíduos participantes deste estudo.** Os espécimes clínicos em estudo foram analisados por dois testes de PCR e por Imunofluorescência direta. Nos testes de PCR foram utilizados dois pares de iniciadores (HL1/HL2 e KL1/KL2) que amplificam regiões do plasmídeo críptico da bactéria. A imunofluorescência direta utiliza anticorpos marcados com fluoresceína voltados para a MOMP. Foram considerados verdadeiros positivos somente os espécimes clínicos que apresentaram positividade em pelo menos dois entre os três testes utilizados.

### 10.1 - Microbiota dos espécimes clínicos da população infectada

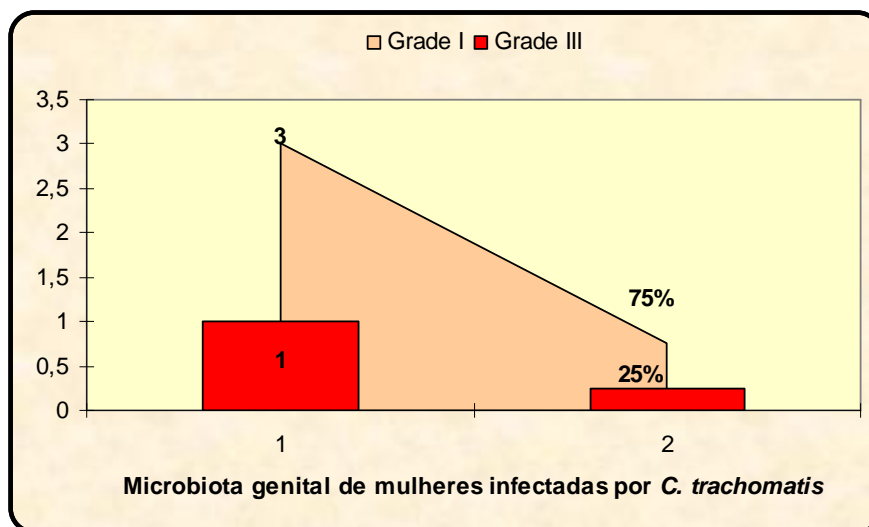
Analisando a população microbiana de espécimes vaginais das mulheres infectadas por *C. trachomatis*, observou-se que 75% das mesmas (n=3) não apresentaram nenhuma alteração na microbiota vaginal e 25% delas (n=1) possuía sua microbiota alterada com características da Grade III (**Figura 15**). Entre os homens, a análise de esfregaços corados pelo método de Gram mostrou que 7,8% dos indivíduos (n = 6) apresentavam diplococos Gram negativos, sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae*, em suas amostras uretrais (**Figura 16**).



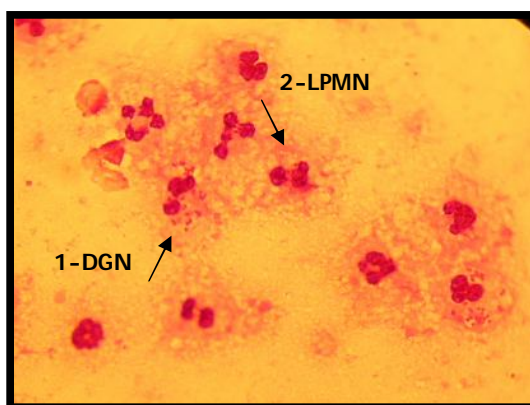
**Figura 13. Aspecto microscópico da microbiota de espécimes vaginais de mulheres que participaram do estudo.** A coleta foi realizada após a introdução do swab no canal vaginal com movimentos rotatório na parede vaginal. O material vaginal foi utilizado para a confecção de esfregaço posteriormente corado pelo método de Gram. As lâminas foram examinadas ao microscópio em aumento de 100X. A Grade I (microbiota normal): Predomínio absoluto de *Lactobacillus* spp.; B. Grade II (microbiota intermediária): Diminuição de *Lactobacillus* spp. e presença de outras bactérias e Grade III (microbiota alterada): Ausência de *Lactobacillus* spp e presença de outras bactérias. Estas figuras representam as 92 amostras clínicas femininas testadas.



**Figura 14. Representação gráfica dos tipos de população microbiana dos espécimes vaginais das mulheres envolvidas neste estudo.** A avaliação microbiana vaginal foi avaliada após a coloração pelo método de Gram, e observado com auxílio de um microscópio em aumento de 100X.



**Figura 15. População microbiana de espécimes vaginais de mulheres infectadas que participaram do estudo.** Grade I (microbiota normal): Predomínio absoluto de *Lactobacillus* spp.; Grade III (microbiota alterada): Ausência de *Lactobacillus* spp. e presença de outras bactérias.



**Figura 16. Foto ilustrativa de esfregaço de secreção uretral masculina infectada.** O espécime clínico foi utilizado para a confecção de esfregaço e coloração pelo método de Gram. Podem ser observados diplococos Gram negativo (1) sugestivos de *Neisseria gonorrhoeae* e numerosos leucócitos polimorfonucleares (2). A avaliação foi realizada em microscópio ótico em aumento de 100X sob imersão. Esta figura é representativa das 77 amostras clínicas masculinas testadas.

## **11 - Avaliação do número de piócitos nos espécimes clínicos da população estudada**

O número de piócitos nos espécimes clínicos de homens e mulheres foi também avaliado após coloração pelo método de Gram. Observou-se que 69,9% dos espécimes clínicos (n=118) mostraram raros piócitos por campo, ou seja, menos de um piócito por campo; 13% indivíduos (n=22) possuíam entre um e quatro piócitos por campo; 5,3% (n=9) entre seis e 10 piócitos e 11,8% pessoas (n=20) apresentaram numerosos piócitos por campo (**Figuras 17**).

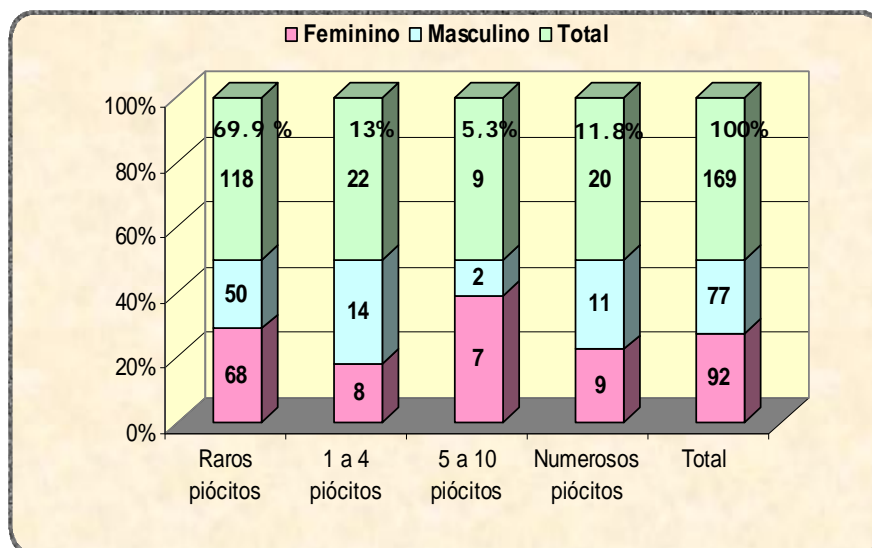
### **11.1 - Números de piócitos nos espécimes clínicos da população infectada**

Na população feminina com resultado positivo para a infecção por *C. trachomatis* foi observado que 75% das mulheres (n=3) apresentaram raros piócitos em seus espécimes clínicos e 25% delas (n=1) mostraram entre um e quatro piócitos por campo (**Figura 18**). Já entre os homens infectados, a análise de seus espécimes uretrais demonstrou que 54,2% deles (n=13) apresentaram raros piócitos; 20,8% deles (n=5) apresentaram entre um e quatro piócitos por campo; 8,3% deles (n=2) de seis a 10 piócitos por campo e 16,7% deles (n=4) mostraram numerosos piócitos por campo (**Figuras 16 e 18**). Foi observado que um indivíduo, correspondendo a 3,6% dos homens infectados apresentou uma co-infecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.

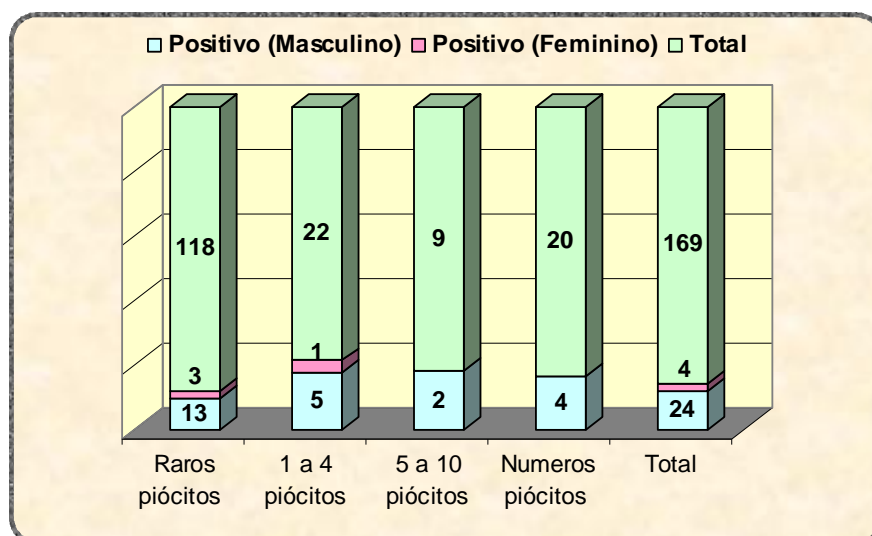
## **12 - Manifestações clínicas relatadas pela população avaliada**

Apenas 18,9% (n=32) da população em estudo e realizando a pesquisa da infecção por *C. trachomatis* em seus espécimes clínicos por imunofluorescência direta, não apresentavam nenhum sinal, sintoma ou manifestação clínica. Estes pacientes foram então considerados sem sintomas. Destes, 14,1% (n=13) eram do sexo feminino e 24,7% (n=19) do sexo masculino (**Figuras 19 e 20**). Na população total 81,1% (n=137) dos indivíduos eram sintomáticos. Destes, 85,9% (n=79) foi direcionada a população feminina e 75,3% (n=58) ao sexo masculino. Na população feminina apresentando sintomas 86% das mulheres (n=68) declararam uma maior

freqüência de corrimento vaginal, seguido de dor pélvica (51,9%; 41 mulheres), dor na relação sexual (49,4%; 39 mulheres), odor fétido (41,8%, 33 mulheres), dor ao urinar (31,6%; 25 mulheres) e aborto (20,3%; 16 mulheres) (**Figura 19**). No sexo masculino a queixa mais freqüente foi corrimento uretral (70,7%; 41 homens), seguida de dor ao urinar (62,1%; 36 homens) e dor na relação sexual (15,5%; nove homens) (**Figura 20**).

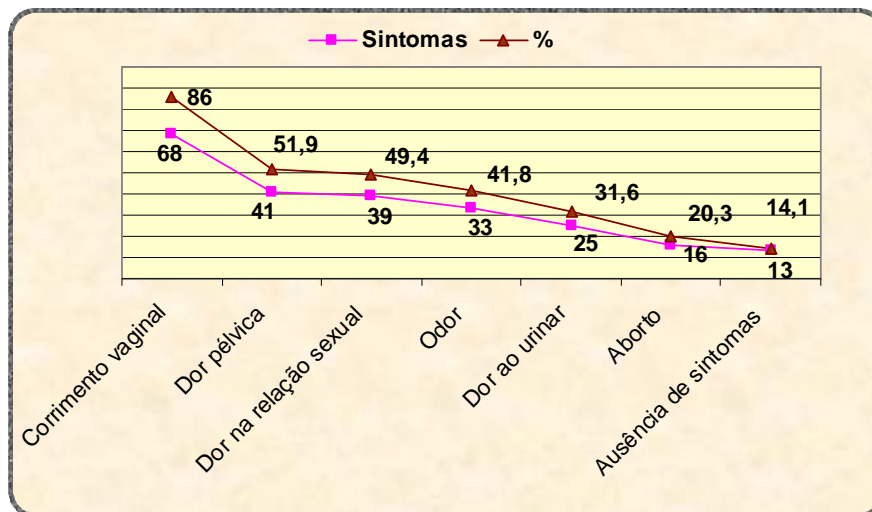


**Figura 17. Avaliação da presença de piócitos em espécimes clínicos de homens e mulheres envolvidos neste estudo.** O número de piócitos foi avaliado em amostras uretrais e vaginais de homens e mulheres, respectivamente. Os espécimes clínicos foram utilizados para a confecção de esfregaços que foram depois corados pelo método de Gram. A contagem do número de piócitos foi feita em microscópio ótico em aumento de 100X sob imersão

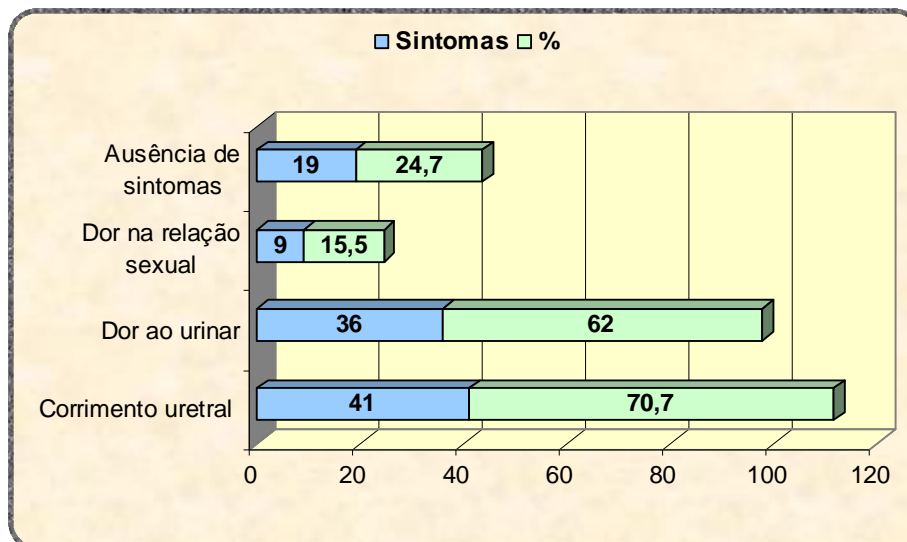


**Figura 18. Número de piócitos nos espécimes clínicos da população estudada e da infectada.**

O número de piócitos foi avaliado em espécimes clínicos infectados de homens e mulheres. Foram analisadas amostras uretrais de homens e endocervicais de mulheres, respectivamente. Foram confeccionados esfregaços que foram depois corados pelo método de Gram. A contagem do número de piócitos foi feita em microscópio ótico em aumento de 100X sob imersão.



**Figura 19. Manifestações clínicas declaradas pelas mulheres envolvidas em estudo.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado às participantes do estudo, no momento da coleta das amostras endocervicais, contendo itens sobre manifestações clínicas (Anexo 2). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).



**Figura 20. Manifestações clínicas relatadas pelos homens envolvidos neste estudo.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras uretrais, contendo itens sobre manifestações clínicas (Anexo 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

### 12.1 - Manifestação clínica de indivíduos infectados

Avaliando os sinais, sintomas e/ou manifestações clínicas presentes na população infectada por *C. trachomatis*, 50% (n=2) das mulheres declararam apenas um sintoma, o aborto, sendo que, uma delas relatou aborto recorrente. Uma mulher (25%) relatou dois sintomas, dor ao urinar e corrimento vaginal, e outra mulher (25%) queixou-se de três sintomas: dor ao urinar, corrimento vaginal e dor na relação sexual (**Tabela 7**).

No grupo masculino infectado por *C. trachomatis*, 50% (n=12) dos homens apresentaram apenas um sintoma sendo o corrimento uretral relatado por 37,5% dos homens (n=9) e a dor ao urinar relatado por 12,5% da população masculina sintomática (n=3). Ainda nesta população, 33,3% (n=8) relataram dois sintomas, sendo corrimento uretral associado à dor ao urinar relatado por 29,2% dos homens (n=7) e dor na relação sexual associado à dor ao urinar relatado por 4,2% dos homens infectados (n=1). A mesma porcentagem (4,2%) o que corresponde a um indivíduo apresentou três sintomas: corrimento uretral, dor ao urinar e dor na relação sexual. Foi também observado que 12,5% (n=3) dos homens infectados por *C. trachomatis* não relataram nenhum sintoma, sinal e/ou manifestação clínica (**Tabela 8**).

<i>Números de sintomas</i>	<i>Sintomas, sinais e/ou manifestação clínica</i>	<i>Infectadas por Ct</i>	<i>%</i>
<i>1 sintoma</i>	Aborto	2	50
<i>2 sintomas</i>	Dor ao urinar + corrimento vaginal	1	25
<i>3 sintomas</i>	Dor ao urinar + corrimento vaginal + Dor na relação sexual	1	25
<i>Total</i>	-----	4	100

**Tabela 7. Sinais, sintomas e manifestações clínicas da população feminina em consequência da infecção por *C. trachomatis*.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado às participantes do estudo, no momento da coleta das amostras endocervicais, contendo itens sobre manifestações clínicas (Anexo 2). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3)

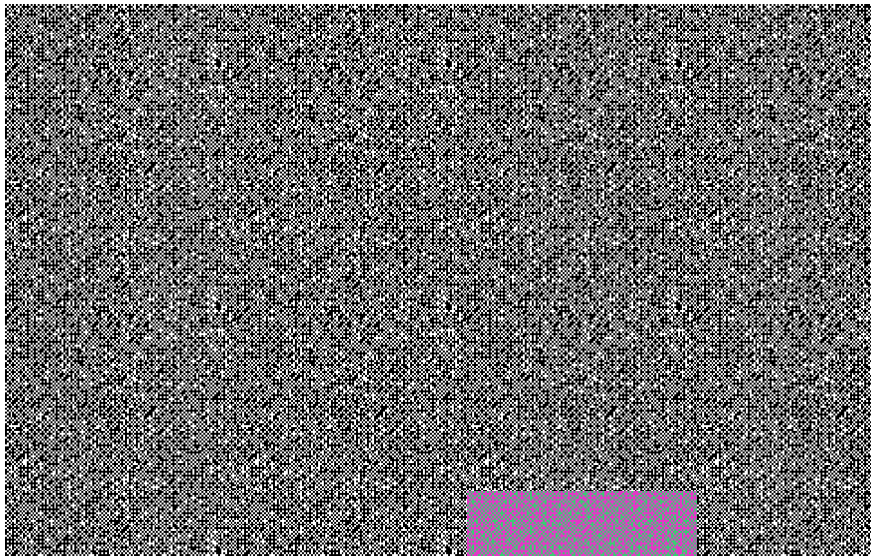
<i>Número de sintomas</i>	<i>Sintomas, sinal e/ou manifestação clínica</i>	<i>Infectados por CT</i>	<i>%</i>
<i>1 Sintoma</i>	Corrimento	9	37,5
	Dor ao urinar	3	12,5
<i>2 Sintomas</i>	Corrimento uretral + dor ao urinar	7	29,2
	Dor na relação sexual + dor ao urinar	1	4,2
<i>3 Sintomas</i>	Corrimento uretral + dor ao urinar + dor na relação sexual	1	4,2
<i>Assintomáticos</i>	Nenhum	3	12,5
<i>Total</i>	-----	24	100

**Tabela 8. Sintomatologia, sinal e/ou manifestação clínica da população masculina infectada por *C. trachomatis*.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes, no momento da coleta das amostras uretrais, contendo itens sobre manifestações clínicas (Anexo 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

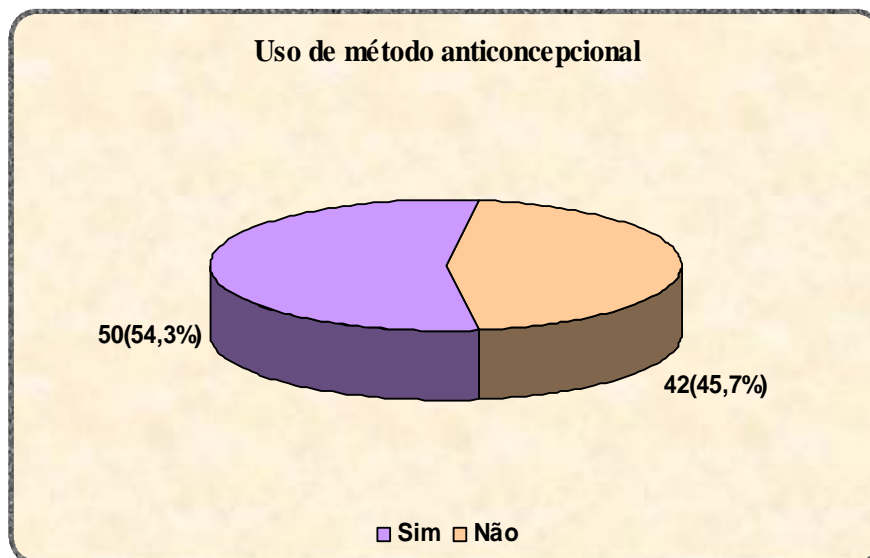
### **13 - Uso de método contraceptível da população avaliada**

Analisando mais detalhadamente o uso de método contraceptível da população em estudo, 53,2% dos homens (n=41) relataram o uso de preservativo em suas relações sexuais (**Figura 21**). Já entre as mulheres 54,3% delas (n=50) relataram o uso de algum método preventivo e 45,7% (n=42) declararam não utilizar método contraceptível (**Figura 22**). Das que fazem uso, 60% (n=30) indicaram o uso de anticoncepcional oral, 20% (n=10) de DIU, 14% (n=7) de preservativo, 4,0% (n=2) de anticoncepcional injetável e 2,0% (n=1) declararam ter feito laqueadura (**Figura 23**).

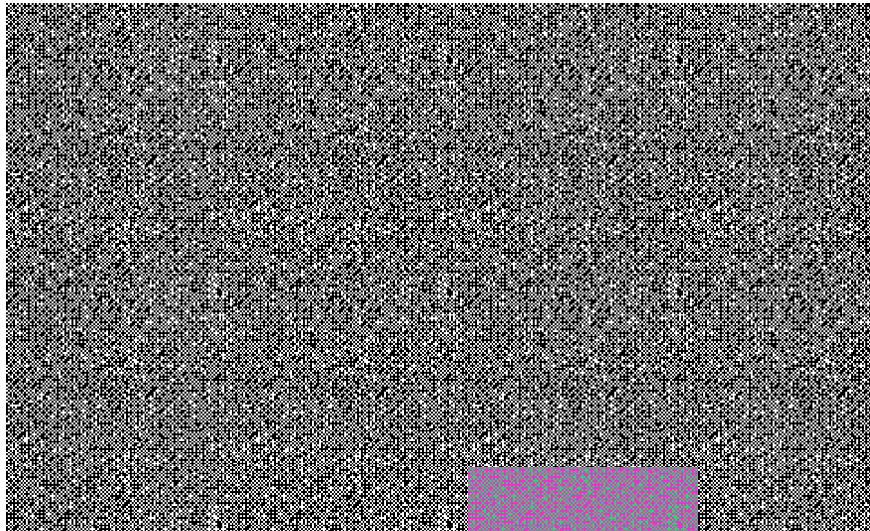




**Figura 21. Uso de preservativo masculino nas relações sexuais.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos homens participantes do estudo no momento da coleta das amostras uretrais, contendo itens sobre a utilização de contraceptivos (Anexo 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).



**Figura 22. Utilização de método contraceptível pelas mulheres participantes do estudo.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado às participantes do estudo, no momento da coleta das amostras endocervicais, contendo itens sobre utilização de contraceptivos (Anexo 2). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

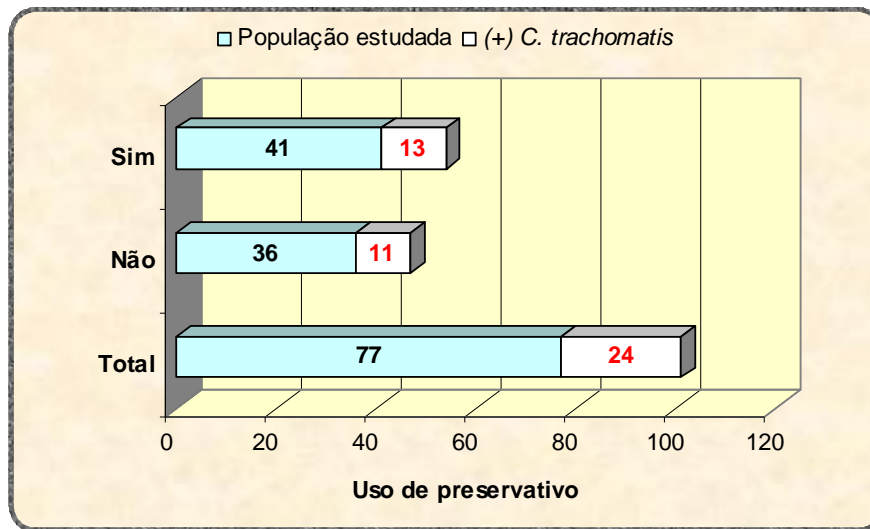


**Figura 23. Método contraceptível utilizado pela população feminina participante do estudo.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado às mulheres, no momento da coleta das amostras endocervicais, contendo itens sobre utilização de contraceptivos (Anexo 2). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

### **13.1 - Método contraceptível utilizado por homens e mulheres infectados**

Quando avaliamos a utilização de preservativos dentro da população masculina observamos que (n=13; 54,2%) dos homens que relataram o uso do preservativo em suas relações sexuais foi detectado a infecção, sendo superior o número de infecção quando não se utilizou o preservativo (n=11; 45,8%) (**Figura 24**).

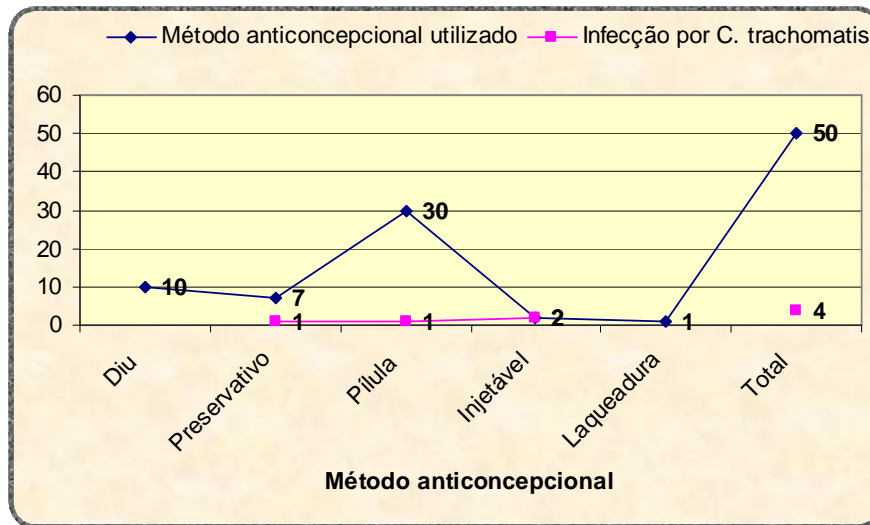
Analisando o método contraceptível da população feminina infectada por *C. trachomatis*, duas (50%) relataram o uso de anticoncepcional injetável, uma (25%) de anticoncepcional oral e uma (25%) de preservativo (**Figura 25**).



**Figura 24. Utilização de preservativo nas relações sexuais por homens infectados por *C. trachomatis*.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos homens, no momento da coleta das amostras uretrais, contendo itens sobre utilização de contraceptivos (Anexo 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

#### 14 - Faixa etária da população avaliada

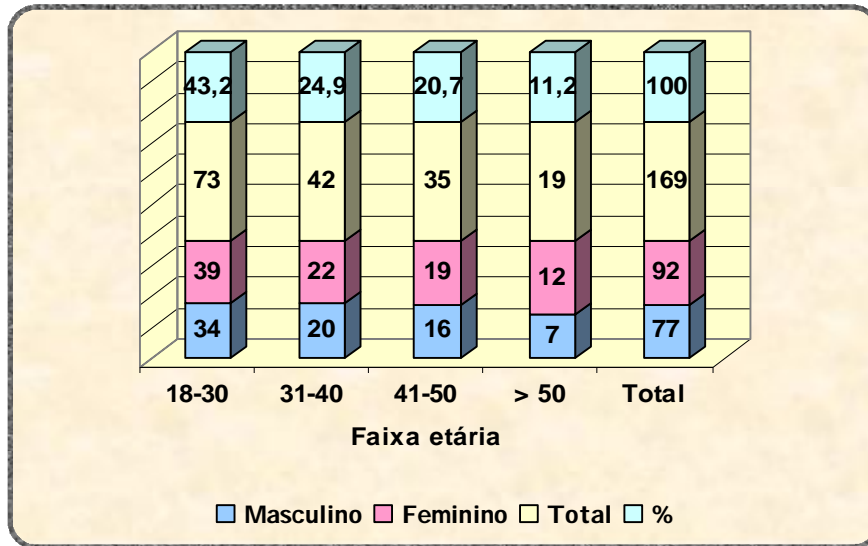
Uma avaliação das idades de homens e mulheres envolvidos neste estudo mostrou uma faixa ampla que variou de 18 anos a 74 anos. A faixa etária mais freqüente foi aquela entre 18 a 30 anos em ambos os sexos, com uma representação de 43,2% (n=73) dos espécimes avaliados. Outra faixa com um número expressivo, 24,9% (n=42), foi aquela entre 31 a 40 anos, seguida pelos indivíduos com idade entre 41 e 50 anos, representando 20,7% (n=35). A população com menor freqüência, > 50 anos de idade representou 11,2% (n =19) da população estudada (**Figura 26**).



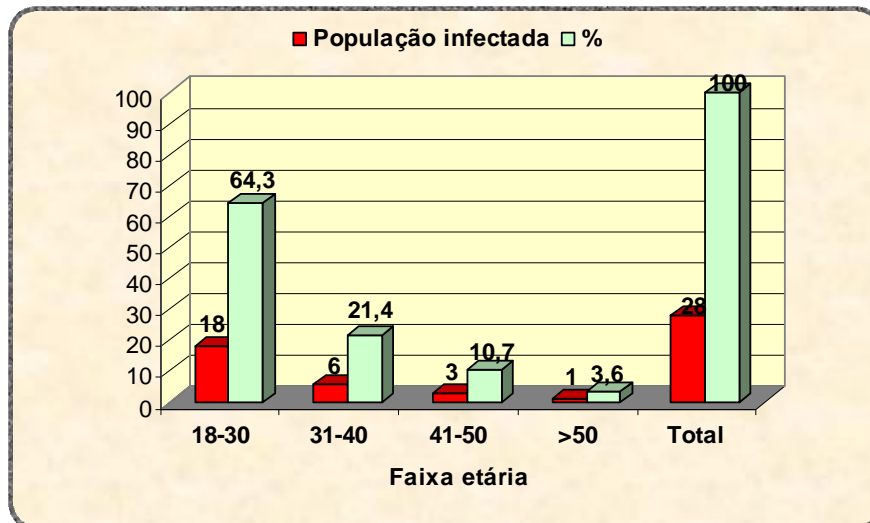
**Figura 25. Métodos contraceptivos utilizados por mulheres apresentando a infecção por *C. trachomatis*.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado às mulheres, no momento da coleta das amostras endocervicais, contendo itens sobre utilização de contraceptivos (Anexo 2). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

#### 14.1 - Faixa etária dos indivíduos infectados

Avaliando a porcentagem de indivíduos infectados por *C. trachomatis*, observou-se que a faixa etária mais afetada foi aquela entre 18 e 30 anos representando 64,3% (n=18). As idades entre 31 e 40 anos, representaram 21,4% (n=6), seguida de 10,7% (n=3) correspondente à faixa etária de 41 e 50 e finalmente 3,6% (n=1) representada por indivíduos >50 anos de idade (**Figura 27**).



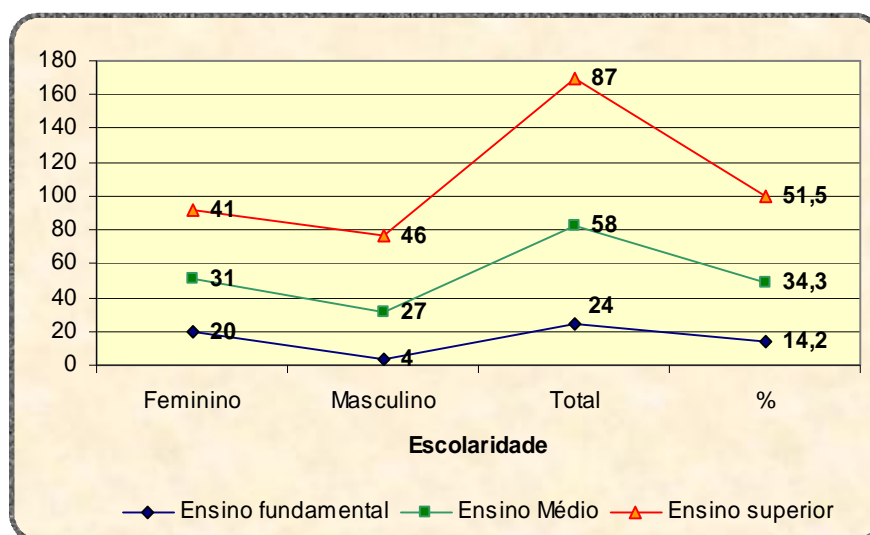
**Figura 26. Faixas etárias da população de homens e mulheres participantes do estudo.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras clínicas, contendo itens sobre a faixa etária (Anexo 2 e 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).



**Figura 27. Faixas etárias de indivíduos positivos para a pesquisa da infecção por *C. trachomatis*.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras clínicas, contendo itens sobre a faixa etária (Anexo 2 e 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

## 15. Escolaridade da população em estudo

O nível de escolaridade de homens e mulheres participantes do estudo também foi avaliado. Observou-se que a maior porcentagem (51,5%) correspondia à população possuindo ensino superior, representada com 87 indivíduos. A seguir vieram os indivíduos com ensino médio, 34,3% (n=58), seguidos daqueles com escolaridade fundamental, 14,2% (n=24). Estes números demonstram uma porcentagem considerável desta população com escolaridade acima do ensino médio (**Figura 28**).



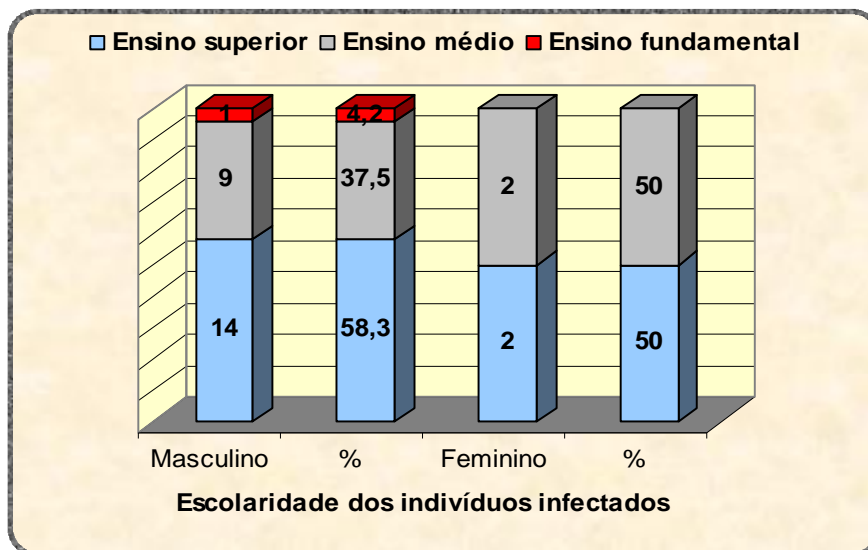
**Figura 28 Escolaridade de homens e mulheres participantes do estudo** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras clínicas, contendo itens referentes à escolaridade (Anexo 2 e 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

### 15.1 - Escolaridade dos indivíduos infectados

A avaliação da escolaridade de homens e mulheres apresentando infecção por *C. trachomatis*, mostrou que, no sexo masculino, a maior frequência da infecção (58,3%; n = 14) ocorreu em indivíduos que possuem ensino superior, seguido daqueles com ensino médio completo (37,5%; n=9). O ensino fundamental mostrou a menor ocorrência, apenas 4,2% (n=1) (**Figura 29**).

Entre as mulheres positivas para a infecção por *C. trachomatis*, observamos uma homogeneidade em relação à escolaridade das mesmas. Foram encontrados

números iguais (n=2) para o nível médio e superior o que corresponde à porcentagem de 50% (**Figura 29**). O nível fundamental de educação não esteve representado dentro da população de mulheres infectadas.



**Figura 29. Escolaridade de homens e mulheres positivos para a infecção por *C. trachomatis*.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras clínicas, contendo itens referentes à escolaridade (Anexo 2 e 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

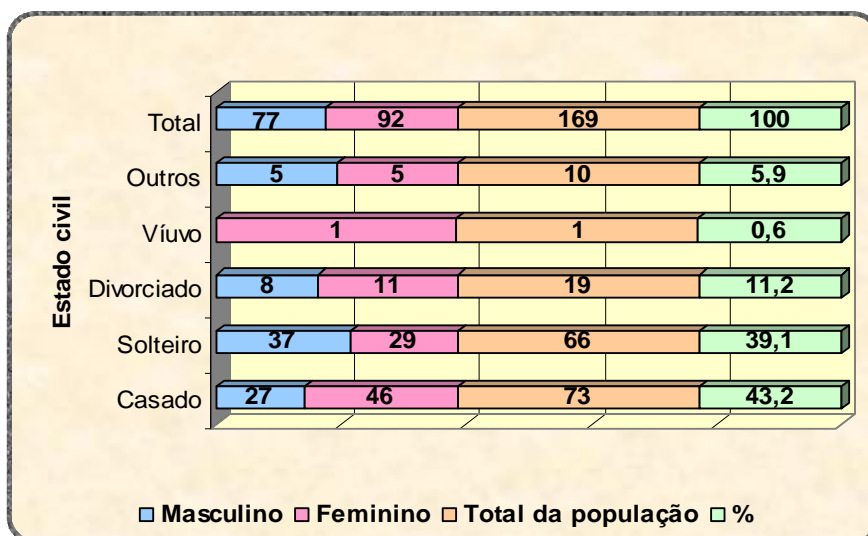
## 16. Estado civil da população estudada

Quanto ao estado civil do grupo em estudo, 43,2% (n=73) relataram ser casados, 39,1% (n=66) solteiros, 11,2% (n=19) divorciados e 0,6% viúva (n=1). Uma taxa de 5,9% (n=10) declarou seu estado civil como outros. Nota-se que, neste estudo, os indivíduos que declararam o estado civil como casado foram os mais frequentes na população feminina. (**Figura 30**).

### 16.1 - Estado civil de homens e mulheres infectados por *C. trachomatis*

Na população masculina infectada por *C. trachomatis*, a maior frequência de infecção foi vista entre os homens solteiros, 58,3% (n=14). A seguir vieram aqueles que se declararam casados, representando 33,3% (n=8) da população avaliada, seguidos dos divorciados, representando 4,2% (n=1) e, finalmente, por aqueles que se declararam como outros 4,2% (n=1).

Entre as mulheres, 75% das infectadas se declararam casadas (n=3) e 25% solteiras (n=1) (**Figura 31**).

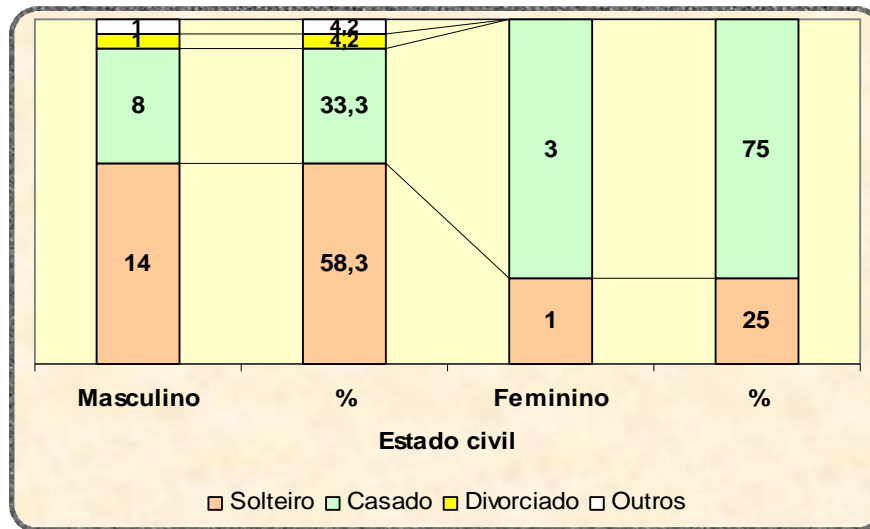


**Figura 30. Estado civil de homens e mulheres participantes do estudo.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras clínicas, contendo itens referentes ao estado civil (Anexo 2 e 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

## 17 - Assistência médica da população avaliada

Na intenção em saber as condições dos indivíduos participantes deste estudo em relação ao acesso a consultas periódicas e/ou em caso de necessidade foi perguntado no questionário disponibilizado no ato da coleta se possuíam plano de saúde privado. Na população de homens e mulheres avaliada, uma porcentagem bem elevada (91,1%; n=154) mostrou possuir plano de saúde privado e apenas 8,9% (n=15) relataram não possuí-lo (**Figura 32**). Quando o grupo em estudo foi questionado sobre acompanhamento ginecológico ou urológico anual, 92,4% das mulheres (n=85) relataram realizar consultas e exames preventivos pelo menos uma vez ao ano, e uma porcentagem muito menor dos homens (37,7% correspondendo a 29 indivíduos), declarou procurar seu urologista anualmente como forma de prevenção (**Figura 33**).

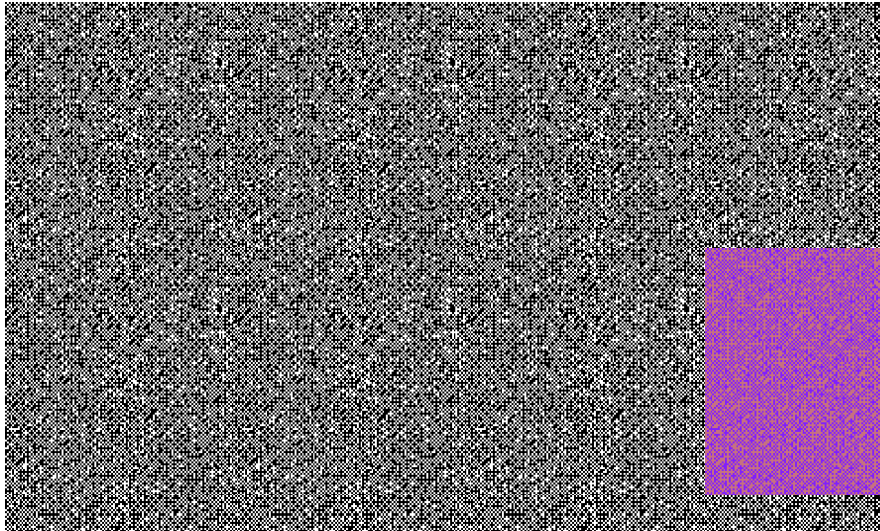




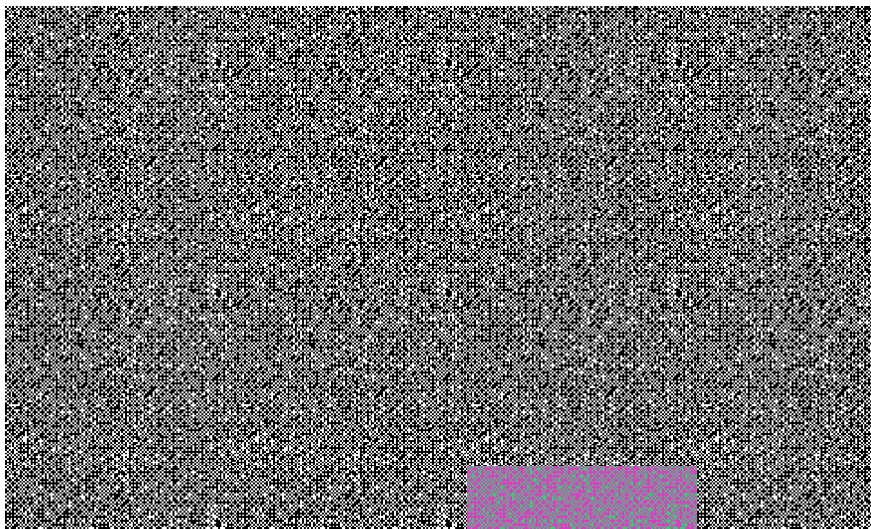
**Figura 31. Estado civil de homens e mulheres positivos para a infecção por *C. trachomatis*.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras clínicas, contendo itens referentes ao estado civil (Anexo 2 e 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

### 17.1 - Assistência médica dos indivíduos infectados

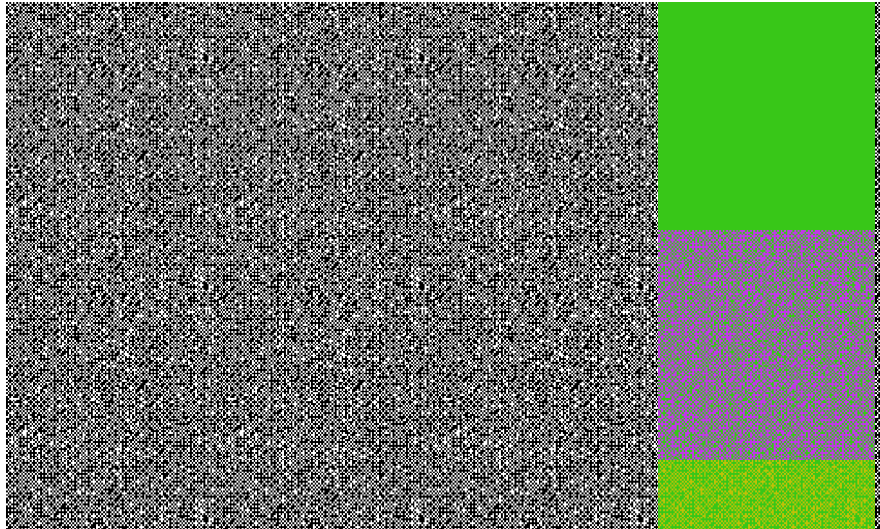
Na população avaliada, e apresentando a infecção por *C. trachomatis*, 21 homens (87,5%) e quatro mulheres (100%) relataram a posse de planos de assistência médica (**Figura 34**). Quanto ao acompanhamento médico anual, a frequência da infecção por *C. trachomatis* foi maior (70,8%, n=17) entre os homens que não realizam consultas preventivas anualmente. Entretanto, ainda no grupo de indivíduos infectados, todas as quatro mulheres infectadas declararam realizar consultas preventivas anualmente (**Figura 35**).



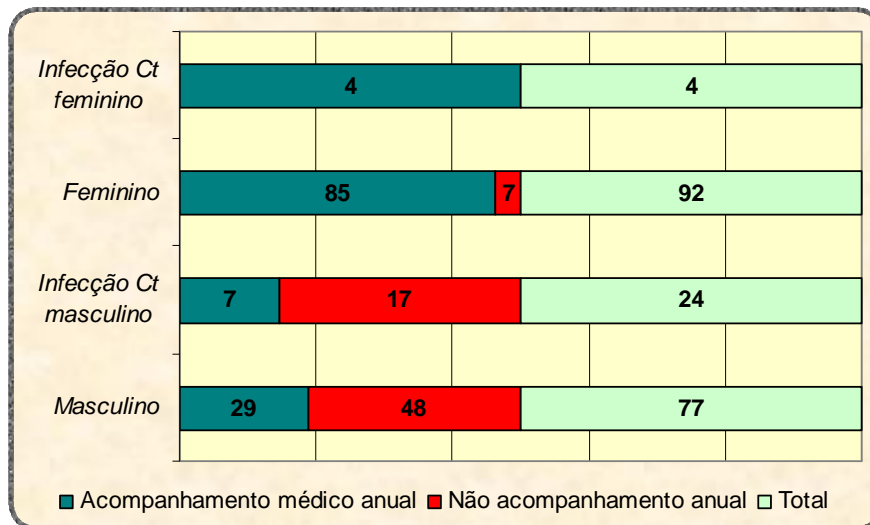
**Figura 32. Porcentagem de homens e mulheres que possuem assistência médica privada.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras clínicas, contendo itens referentes ao plano de saúde (Anexo 2 e 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3). Sim: Indivíduos possuem plano de saúde; Não: Indivíduos que não possuem plano de saúde.



**Figura 33. Porcentagem do grupo em estudo que realizam consultas e exames preventivos anualmente.** Os dados foram coletados a partir das respostas ao questionário aplicado aos participantes do estudo, no momento da coleta das amostras clínicas, contendo itens referentes a exame ginecológico ou urológico anual (Anexo 2 e 3). As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).



**Figura 34. Relação de pessoas infectadas e aquisição de plano de saúde.** No questionário aplicado aos pacientes, antes da coleta das amostras endocervicais e uretrais, constavam um item sobre plano de saúde momento da coleta. As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3). Sim: Possuem plano de saúde; Não: Não possuem plano de saúde.



**Figura 35. Relação de homens e mulheres infectados e a realização de exames preventivos anualmente.** No questionário aplicado aos pacientes, antes da coleta das amostras endocervicais e uretrais, constavam um item sobre acompanhamento médico preventivo anualmente. As respostas foram analisadas posteriormente pelo programa Epi Info (versão 3.4.3).

## VI- DISCUSSÃO

No Brasil, as doenças sexualmente transmissíveis que fazem parte da lista nacional de notificação compulsória compreendem a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), de gestantes HIV positivas, de crianças expostas ao HIV, de gestantes com sífilis e de crianças com sífilis congênita; praticamente inexistem dados de incidência do restante das DST em nível nacional (PN – DST/AIDS).

Compreender a dinâmica dessas doenças é fundamental, pois são silenciosas ao afetar homens e mulheres, jovens e adultos e de distintos extratos sociais, e loquazes ao cobrar seus tributos em forma de doença inflamatória pélvica e infertilidade feminina e masculina, câncer do colo uterino, infecções congênitas ou neonatais, aumento do risco de infecção pelo HIV, entre outros. É, assim, fundamental que se possa dar à população mais que medicamentos, mas plena saúde sexual e reprodutiva (PN – DST/AIDS). No Brasil, um país de imensa extensão territorial e marcantes diferenças regionais, a magnitude destas infecções de transmissão sexual não é, ainda, amplamente conhecida.

O trabalho de nosso grupo é motivado pela carência de dados na literatura sobre a freqüência da infecção por *C. trachomatis* em nosso país, especialmente no sexo masculino, e pela importância de se compreender melhor a dinâmica desta infecção silenciosa em nossa sociedade. Paralelamente, investigamos testes que possam ser utilizados como alternativas aos métodos utilizados em outros países, normalmente onerosos para o nosso sistema público de saúde e assistência médica particular, dificultando a pesquisa desta infecção em nossos homens e mulheres. Estas bactérias são potencialmente transmissíveis pelo contato sexual e que podem evoluir para complicações com seqüelas importantes, entre elas a infertilidade.

Neste trabalho, comparamos três métodos de diagnóstico para a infecção por *C. trachomatis* e levantamos características de uma população de 169 pessoas, 77 homens e 92 mulheres (**Figura 5**), que assinaram o termo de consentimento (**Anexo1**) durante o período de outubro de 2007 a setembro de 2008 (**Figura 4**). Estas pessoas procuraram unidades do Instituto Hermes Pardini (IHP), a maior rede de laboratórios de análises clínicas de Belo Horizonte, com o objetivo de pesquisar *C. trachomatis* atendendo à solicitação médica. Com este objetivo, no IHP foram coletados os espécimes uretrais masculinos e endocervicais femininos, que foram,

posteriormente, utilizados para a pesquisa da infecção pelo método de imunofluorescência direta no próprio Instituto. Paralelamente, outra amostra do espécime clínico foi coletada para a pesquisa da infecção por dois testes de PCR.

Durante vários anos, o método considerado padrão ouro para o diagnóstico da infecção para *C. trachomatis* foi seu cultivo em monocamada de fibroblastos murinos. Entretanto, devido à complexidade para o cultivo deste microrganismo, uma variedade de testes surgiu entre eles a imunofluorescência direta (IFD), hoje uma das mais utilizadas, e as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs). Esta variedade de técnicas permitiu também uma diversidade de espécimes clínicos a serem utilizados para a pesquisa da infecção, como *swab* endocervical e uretral, urina e *swab* vaginal coletado pelo próprio paciente (Greer et al., 2008). A escolha do material a ser utilizado para a pesquisa da infecção é importante quando se considera o método de detecção a ser utilizado, seja por causa da sensibilidade ou por motivos relacionados à viabilidade da bactéria. Para o diagnóstico de *C. trachomatis* pelo método IFD, a amostra biológica coletada tem um prazo de sete dias até a realização do mesmo. Os testes de NAAT os espécimes clínicos podem ser processados após períodos maiores de tempo. Estes testes têm, ainda, a vantagem de possuírem uma maior sensibilidade e especificidade.

Neste trabalho, comparamos a sensibilidade e especificidade de três testes: a imunofluorescência direta e dois testes de PCR. Comparamos uma PCR (iniciadores HL1/HL2), desenhada por nosso grupo (Lima et al., 2007), e outra PCR disponível na literatura (iniciadores KL1/KL2, Mahony et al., 1992), utilizando o teste de imunofluorescência direta (OMEGA DIAGNOSTICS) como padrão ouro. Os dois testes moleculares têm como alvo regiões diferentes do plamídeo críptico da bactéria. Os iniciadores HL1/HL2 amplificam um fragmento de 512 pb e KL1/KL2 um fragmento de 241 pb. Por outro lado, a imunofluorescência direta utiliza um anticorpo específico para uma região antigênica da principal proteína de membrana externa (MOMP) da bactéria.

Para a realização dos testes de amplificação do material genético do microrganismo a partir das amostras clínicas é fundamental investigar e, se necessário, eliminar a ação de inibidores da reação, que poderiam ocasionar falsos negativos. Neste sentido, foi inicialmente realizada a amplificação do gene constitutivo da  $\beta$ -globina. Inicialmente 89,9% das amostras mostraram amplificação

de um fragmento de 209 pb (**Figura 6**), indicando uma boa condição do DNA para a reação de amplificação. Esta porcentagem aumentou para 96,4% quando as amostras, inicialmente negativas, foram diluídas em H<sub>2</sub>O milliQ, procedimento que diminui a ação de possíveis inibidores. Embora seis amostras (3,6%) tenham permanecido negativas, realizamos a pesquisa da bactéria com todas as amostras, uma vez que sendo amostras clínicas, são preciosas. Acreditamos que, se presente, o material genético da bactéria pudesse ser detectado, mesmo na ausência de amplificação do gene da  $\beta$ -globina.

A PCR HL1/HL2 (**Figura 7**) detectou 24 indivíduos positivos para infecção de *C. trachomatis* (14,2%) (**Figura 10**) sendo 21 (87,5%) homens e três mulheres (12,5%) (**Tabela 6**). A PCR KL1/KL2 (**Figura 8**) detectou 30 indivíduos infectados (17,7%) (**Figura 10**) na população avaliada. Neste grupo, 25 homens (83,3%) e cinco mulheres (16,7%) (**Tabela 6**). Por outro lado, a imunofluorescência direta (**Figura 9**), realizada no IHP encontrou uma freqüência total de 13,6% da infecção (23 indivíduos) (**Figura 10**) sendo 14 homens (60,9%) e nove mulheres (39,1%) (**Tabela 6**).

Analisando o desempenho dos métodos utilizados (**Tabela 6**), verificamos uma concordância de 82,2% entre os resultados, sendo 10 amostras (5,9%) positivas e 129 (76,3%) negativas diagnosticadas pelos três métodos. Observamos ainda que quatorze amostras são positivas apenas pelos dois testes de biologia molecular utilizados (**Tabela 6**), tendo sido negativos pelo método de imunofluorescência direta. Este resultado pode ser explicado pela maior sensibilidade de testes de amplificação de ácido nucléico (NAAT), sendo capazes de detectar pequenas quantidades de ácidos nucléicos em amostras clínicas (Seadi et al., 2002; Gaydos et al., 2004; Boyadzyan et al., 2004). Nossos resultados confirmam, assim, o que outros trabalhos vêm mostrando, que a sensibilidade de métodos convencionais para detecção de *C. trachomatis* baseado em cultura e detecção de antígenos, têm sido superada por testes de NAAT, inclusive quando amostras não genitais são avaliadas (Gaydos et al., 2004; Jeperson et al., 2005).

Dez amostras (5,9%) apresentaram resultado positivo apenas pelo método de imunofluorescência direta (**Figura 9**) sendo negativas para os dois testes moleculares. É importante lembrar que a imunofluorescência detecta alvo diferente dos testes de PCR utilizados, já tendo sido descritos casos de linhagens da bactéria

defectivas para o plasmídeo (Peterson et al., 1990; An et al., 1992; Farencena et al., Thomas et al., 1997; Matsumoto et al., 1998; Stothard et al., 1998;1999; Seadi et al., 2002). Esta hipótese foi investigada pela tentativa de amplificação de um fragmento de 1015 pb do gene *omp1*, codificador da MOMP. Uma amostra resultou positiva (**Figura 11**), indicando ser a infecção causada por uma linhagem de bactéria que não possui o plasmídeo. Importante mencionar que a PCR dirigida ao gene *omp1* é menos sensível que aquela direcionada ao plasmídeo, pois é um gene de cópia única enquanto o plasmídeo possui de sete a dez cópias (Seadi et al., 1999).

Recentemente foi descrita na Suécia uma variante de *C. trachomatis* apresentando uma deleção de 377 pb no plasmídeo críptico o que poderia gerar um resultado falso negativo em testes de PCR voltados para o plasmídeo (Unemo et al, 2007). Entretanto, este trabalho chama a atenção para a existência de linhagens de *C. trachomatis* apresentando deleções nas seqüências gênicas de seus plasmídeos, alvo de testes para o diagnóstico da infecção. Não se pode descartar a hipótese de que deleções em outras regiões do plasmídeo possam existir, e desta forma, interferir nos testes de amplificação do material genético da bactéria.

A presença de inibidores e uma baixa qualidade do DNA, por sua vez, foram descartadas pela amplificação do gene da  $\beta$ -globina em 96,4% das amostras analisadas (**Figura 6**). No entanto, é preciso lembrar que na coleta dos espécimes clínicos, o material para a realização da imunofluorescência precedeu o da PCR. É possível existirem diferenças na qualidade e quantidade de material para a realização dos dois testes. Wesh et al. (1997) avaliando a adequação de espécimes clínicos para a detecção de *C. trachomatis* por imunofluorescência direta, depositados em lâmina antes de serem processados para a PCR, verificaram que 2,8% das amostras eram positivas na imunofluorescência e negativas na PCR. Sugeriram, então, que os espécimes clínicos poderiam ter sido depositados, em sua maior parte, na lâmina utilizada para a IFD, restando um material mais pobre para o teste de PCR. É interessante ressaltar que no presente estudo uma amostra negativa na amplificação da  $\beta$ -globina e nos dois testes de PCR para a detecção da bactéria se mostrou positiva pelo teste de imunofluorescência direta.

Além das hipóteses apresentadas acima, é preciso considerar, ainda, a possibilidade de resultados falsos positivo para as outras nove amostras positivas para a IFD e negativas para a PCR. Santos et al. (2003), analisaram a infecção por

*C. trachomatis* em uma população feminina no município de Manaus e observaram uma discrepância nos resultados entre testes deIFD e PCR. Encontraram 27,1% de positividade por DFA e 20,7% por PCR. Sugeriram que este resultado possa estar relacionado à baixa especificidade do método de imunofluorescência direta, uma vez que existe a possibilidade de reação cruzada com outras bactérias Gram-negativas, sugerindo, assim, resultados falsos positivo.

É interessante observar que quando avaliamos o sexo dos indivíduos que obtiveram resultado positivo somente no teste de imunofluorescência direta, observamos que seis (66,7%) dos nove (100%) são do sexo feminino (**Tabela 6**). É possível, assim, que a microbiota genital feminina possa corroborar para reação cruzada uma vez que é composta por uma variedade de microrganismos, diferente dos homens que não possuem microbiota uretral.

A comparação dos dois testes de PCR mostrou que os iniciadores HL1/HL2 amplificaram 14,2% e os iniciadores KL1/KL2, por sua vez, amplificaram 17,7% da população. Desta forma, ambas as PCR obtiveram 90,5% de resultados semelhantes nos espécimes clínicos analisados, indicando bons testes para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*. Observando os resultados discrepantes entre as PCR (9,5%), os iniciadores HL1/HL2 não detectaram 1,8% dos resultados verdadeiramente positivo, uma vez que o diagnóstico da infecção foi constatado também pelo método de imunofluorescência direta. Entretanto, a PCR KL1/KL2 se mostrou como único indicador da infecção em 1,8% de amostras positivas. Por outro lado, este mesmo teste detectou 1,8% de amostras verdadeiramente positivas que a PCR HL1/HL2 não detectou (**Tabela 6**).

A sensibilidade é a capacidade que um teste possui de identificar os indivíduos verdadeiramente positivos e especificidade corresponde à capacidade do teste de indicar os indivíduos verdadeiramente negativos. Assim, considerando como padrão ouro o teste de imunofluorescência direta, a sensibilidade e especificidade dos testes para os iniciadores HL1/HL2 e KL1/KL2 foram, 43% e 91% e 57%, 88%, respectivamente. Os valores Preditivo Positivo (VPP) e Valores Preditivo Negativo (VPN) de ambas PCR foram respectivamente, 42% e 91% para a PCR HL1/HL2 e 43,0% e 93% para a PCR realizada com iniciadores KL1/KL2. A sensibilidade e o VPP das PCR em ambos os testes foram relativamente baixos, isto pode ser explicado devido ao teste usado como padrão ouro, que apresentou resultados



discrepantes quando comparado com ambas PCR. Desta forma, avaliamos a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN entre as PCR. Considerando o KL1/KL2 como padrão ouro, verificou-se que a PCR HL1/HL2 demonstrou uma sensibilidade de 80%, especificidade 100%, VPP 100% e 96% de VPN. Entretanto, considerando a PCR HL1/HL2 como padrão ouro os parâmetros da PCR KL1/KL2 foram, 100%, 96%, 80% e 100%, respectivamente. Os testes com alta especificidade são importantes quando o objetivo é confirmar um diagnóstico e testes com alta sensibilidade são importantes quando se quer realizar a triagem de uma determinada doença. Desta forma, com base nos valores encontrados a PCR HL1/HL2 demonstrou um bom teste quando o objetivo é a confirmação do diagnóstico de infecção por *C. trachomatis*, uma vez que sua especificidade foi superior ao PCR KL1/KL2. Por outro lado, a PCR KL1/KL2 demonstrou uma sensibilidade maior ao PCR HL1/HL2, indicando um bom teste para triagem da infecção. Com relação aos valores preditivo positivo e negativo, sabe-se que VPP expressa a probabilidade de um paciente com o teste positivo ter a doença e VPN expressa a probabilidade de um paciente com o teste negativo não ter a doença. Assim, os iniciadores HL1/HL2 utilizados demonstrou que 24 pacientes diagnosticados infecção por *C. trachomatis*, possui uma probabilidade de 100% de serem verdadeiramente positivos. Por outro lado, 139 pacientes com resultados negativos pelo teste KL1/KL2 possui uma probabilidade 100% de serem verdadeiramente negativo. Entretanto, seria interessante o seqüenciamento do material amplificado para a confirmação dos resultados positivos somente pelo teste KL1/KL2. É oportuno lembrar que, apenas PCR-KL1/KL2 estando positivo, não pode ser utilizado como diagnóstico, pois segundo o CDC, é necessário um resultado positivo em dois testes para um diagnóstico positivo da infecção.

De qualquer modo, nove amostras que apresentaram positividade somente pela imunofluorescência direta e três apresentando resultados positivos somente pela PCR KL1/KL2 (**Tabela 6**) foram considerados falsos positivos para infecção por *C. trachomatis*. Estes resultados exemplificam a importância da adequação recomendada pelo CDC, que preconiza que o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* seja feito pela cultura somente ou por dois métodos não culturais paralelos. Este cuidado é necessário especialmente em população de baixa a moderada prevalência (1% a 7%) da infecção por *C. trachomatis* ou quando o valor

preditivo positivo (VPP) de testes está abaixo de <90%. Devido a esta preocupação o CDC sugere várias estratégias para confirmação, (i) testar uma segunda amostra com diferentes testes ou alvos, (ii) realizar um segundo teste de amplificação de ácidos nucleicos com alvos diferentes na seqüência de ácidos nucleicos no espécime original, (iii) repetir o teste inicial na amostra original, ou (iv) pedir ao paciente que volte para coletar uma nova amostra clínica (Schachter et al., 2006).

Os resultados do presente estudo mostram, também, o valor do diagnóstico por PCR, que mostrou um aumento na detecção de homens e mulheres verdadeiramente infectados por *C. trachomatis*. A utilização dos testes de PCR permitiu o diagnóstico de 14 casos da infecção (50% dos casos) (**Tabela 6**) que se mostraram negativos pelo teste de imunofluorescência direta. Desta forma, estas infecções poderiam não ter sido detectadas se apenas a imunofluorescência direta houvesse sido realizado e não os testes de PCR. A eficácia de testes para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* pode variar entre diferentes técnicas utilizadas. Entretanto, estudos avaliando diferentes tipos de PCR comercial assim como ensaios de PCR *in house* têm mostrado que são altamente sensíveis para a detecção de *C. trachomatis* em espécimes clínicos (George et al., 2003).

Programas para um controle efetivo das infecções por *C. trachomatis* têm sido introduzidos em várias áreas metropolitanas nos Estados Unidos e Canadá, assim como em vários países ocidentais da Europa, o que tem resultado em declínio acentuado na prevalência de infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* nas populações alvo (Van De Pol et al., 2001).

Entretanto, nos serviços públicos no Brasil, como na maioria dos países da América Latina, a triagem para *C. trachomatis* não é oferecido rotineiramente para jovens homens ou mulheres (Fioravante et al., 2005). De maneira geral, mesmo nos serviços privados, a pesquisa da infecção apenas é realizada nos casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais relata a presença de bactéria (Passos et al., 2002). Vários estudos realizados no Brasil, em grupos populacionais diversos, por metodologias variadas, mostram que a freqüência da infecção por *C. trachomatis* em mulheres oscila entre 2,1% a 31,5% (Marques et al., 2005; Lima et al., 2007; Marques et al., 2007) sugerindo a importância de um acompanhamento mais sistematizado desta infecção.

Em nosso trabalho avaliamos uma população diversificada, com faixa etária variando de 18 a 74 anos e pessoas atendidas em uma das maiores rede de laboratórios particulares de uma importante capital brasileira. Podemos supor que nesta população existam pessoas de diferentes camadas sociais realizando a pesquisa da infecção em decorrência de um pedido médico. A população em estudo totalizando 169 indivíduos foi composta por 45,6% de homens e 54,4% de mulheres **(Figura 5)**, proporções equivalentes, o que nos permitiu avaliar a freqüência da infecção entre os sexos.

Neste estudo foram considerados positivos para a infecção de *C. trachomatis* somente os indivíduos com pelo menos dois testes positivos simultaneamente. Assim, na população analisada verificamos um total de 28 pessoas infectadas por *C. trachomatis*, correspondendo a 16,6% da população. A freqüência da infecção foi de 31,2% para o sexo masculino e 4,3% para sexo feminino **(Figura 12)**. Estes resultados chamam a atenção para a alta freqüência da infecção por *C. trachomatis* na população masculina quando comparado com a feminina. É interessante observar que as duas populações procuraram o Instituto Hermes Pardini para realizar exame de imunofluorescência direta a pedido de seus respectivos médicos. Assim acreditamos que o fato de o quadro clínico em homens ser mais claro que em mulheres, ocorrendo dor ao urinar, secreção uretral, sensação de ardor no canal uretral, característicos de uretrite em homens, seja um fator que estimule a busca por assistência médica.

Nossos resultados adquirem uma relevância maior quando verificamos o baixo número de estudos investigando a infecção por *C. trachomatis* em homens, sendo, de maneira geral, realizada em decorrência de sinais e/ou sintomas. Entretanto, sendo esta uma infecção muitas vezes assintomática, seqüelas graves como uretrite, epididimite e mesmo a esterilidade podem ocorrer. É importante ressaltar, ainda, que a ausência de detecção da infecção nos homens permite a manutenção da infecção na população permitindo a transmissão da infecção para as parceiras de sexo.

Como em outros países, no Brasil, existem poucos estudos direcionados para a população masculina investigando a freqüência de infecção por *C. trachomatis*, o que dificultou uma análise comparativa dos achados. Um destes poucos estudos relatou uma freqüência de 23,3% da infecção por *C. trachomatis* em soldados

sintomáticos no Estado do Rio de Janeiro (Castro et al., 2000), uma frequência menor que aquela detectada na população masculina em estudo, que também apresentou sintomatologia em sua grande maioria (**Figura 20**). Outro estudo verificou a frequência da infecção em homens militares, estes assintomáticos, no Município de Goiás. Nesta população a frequência foi de 5,0% dos homens (Fioravante et al., 2005). Resultados preliminares, de nosso grupo, utilizando a mesma PCR, HL1/HL2, para a investigação da infecção em uma população de 100 homens atendidos em uma Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte, mostrou uma frequência muito mais baixa da infecção (2%) (Chitacumuta et al., 2007). O PN-DST/AIDS (2008) realizou, em seis cidades do Brasil um grande estudo no período de 2004 a 2007 com o objetivo de investigar a frequência de microrganismos sexualmente transmissíveis em populações de homens e mulheres. Foi utilizado, como método de diagnóstico, o teste de PCR Cobas Amplicor CT/NG (Roche). Na população masculina, um total de 3600 industriários participou do estudo. Neste grupo a prevalência da infecção foi de 3,4%. As taxas para os integrantes de cada uma das cidades participantes, em ordem decrescente, foram: Fortaleza, 4,0%; Porto Alegre, 4,0%; Goiânia, 3,8%; Rio de Janeiro, 3,4%; Manaus, 3,0% e São Paulo, 1,6%. A frequência da infecção por *C. trachomatis* na população masculina neste estudo (31,2%) (**Figura 12**) foi superior a de alguns trabalhos realizados em outros países que encontraram taxas variando de 3,2% a 7,8% (Bakken et al., 2006; Rietmeijer et al., 2008; Satterwhite et al., 2008). Entretanto, uma pesquisa realizada por imunofluorescência direta em população masculina sintomática detectou 36,7% de positividade em espécimes uretrais (Agrawal et al., 2003) e outro utilizando ensaio imunoenzimático e PCR encontrou 32% (Mahony et al., 1992).

A frequência de infecção de *C. trachomatis* encontrada no sexo feminino neste estudo apresentou uma porcentagem de 4,1%, (**Figura 12**) estando próximo de outros estudos que mostraram uma frequência variando de 3,6% a 8,9% (Soares et al.; 2003; Miranda et al., 2004; Corneta et al., 2006; Oliveira et al., 2007; Medeiros et al., 2007; Zarakolu et al., 2008). No entanto, este resultado pode ser considerado baixo quando se compara com outros estudos (Santos et al., 2003; Araújo et al., 2006; Lima et al., 2007; Porras et al., 2008) onde o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* variou entre 14,2% a 20,7%. Importante lembrar que a variação da

freqüência da infecção de *C. trachomatis* depende da população estudada assim como do método de diagnóstico utilizado.

Em consequência de muitas infecções no trato genital feminino a microbiota vaginal sofre alterações e tem sido utilizada, algumas vezes, como um balizador da saúde do trato genital feminino. Neste estudo buscamos verificar alterações na microbiota vaginal com o objetivo de detectar alterações associadas à infecção por *C. trachomatis*. O critério de Amsel et al. (1983) e o score de Nugent et al. (1991) são amplamente utilizados para o diagnóstico de vaginose bacteriana, pois são métodos que tem demonstrado excelente reprodutividade. A vaginose bacteriana pode ser diagnosticada clinicamente pela presença de três ou quatro critérios de Amsel que são: (I) secreção vaginal, (II) pH > 4,5, (III) presença de *clue cells* à fresco e (IV) odor de peixe depois da adição de KOH 10% em água (Donders et al., 2007). O sistema de score Nugent é classificado de 0 a 10, avaliando quantitativamente três morfotipos bacterianos pela coloração de Gram: Bastonetes Gram positivos (indicativo de *Lactobacillus* spp.), Cocos-bacilos Gram variáveis (indicativo de *Gardnerella*) e bastonetes curvos Gram variáveis (indicativo de *Mobiluncus* spp) (Demba et al., 2005) o que pode não refletir a diversidade e complexidade da microbiota vaginal (Verstraelen et al, 2007). Desta forma, para investigarmos alterações na microbiota vaginal em mulheres positivas para a infecção por *C. trachomatis* pelo método de Gram, utilizamos o critério de Grade simplificado de amostra vaginal validado por Ison et al. (2002) que considera toda a população microbiana presente na microbiota vaginal. Avaliando a microbiota das 92 mulheres

participantes deste estudo, 68,5% apresentaram uma população microbiana com predomínio absoluto de *Lactobacillus* spp., denominada Grade I (**Figuras 13A e 14**), 14,1% destas mulheres apresentaram Grade II (**Figuras 13B e 14**), o que demonstra uma diminuição do número de *Lactobacillus* spp. e presença de outras bactérias e 17,4% das mulheres apresentaram Grade III (**Figuras 13C e 14**), característica de vaginose bacteriana. A vaginose bacteriana é caracterizada pela substituição da microbiota predominante de *Lactobacillus* spp. por microrganismos anaeróbios, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp e *Bacteroides* spp. (Bhalla et al., 2007; Donders et al., 2007). A infecção por estes microrganismos tem sido mencionada como facilitadora de infecção do trato genital por *C. trachomatis* e

*N. gonorrhoeae* e causando endometriose, salpingites e juntos ocasionando doença inflamatória pélvica (Ness et al., 2005).

Microbiota vaginal que caracteriza a Grade I (**Figura 13A**) é relatada por vários autores como fator de proteção contra infecções urogenitais (Newton et al., 2001; Vasquez et al., 2002). Observamos que 68,5% das mulheres deste estudo foram classificadas como Grade I (**Figura 14**), em concordância com a baixa taxa de infecção por *C. trachomatis* nesta população. Embora seja baixo o número de mulheres infectadas por esta bactéria na população de nosso estudo, é interessante ressaltar que uma das quatro mulheres positivas para a infecção apresentou microbiota vaginal característica de Grade III (**Figuras 13C e 15**). Entretanto, para as outras três mulheres positivas para a infecção a microbiota vaginal foi classificada como Grade I (**Figura 13A e 15**). Desta forma, o baixo número de mulheres infectadas encontrado neste estudo não permitiu uma avaliação da relação da microbiota vaginal frente à infecção por *C. trachomatis*. No entanto, um estudo realizado em 2003 com 225 mulheres mostrou uma associação de alterações da microbiota vaginal e infecções por *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae*, sugerindo uma forte interação de vaginose bacteriana e doenças sexualmente transmissíveis (Wiesenfeld et al., 2003).

O diagnóstico de uretrite não gonocócica, muitas vezes, é realizado, por evidência microscópica, e definido pela detecção de um número igual ou maior que cinco leucócitos polimorfonucleares (LPMN) por campo, encontrados em cinco ou mais campos, em amostras genitais coradas pelo método de Gram (**Figura 16**) (Bradshaw et al., 2006).

Avaliando a contagem de LPMN nas amostras genitais de homens e mulheres (**Figura 14**) na população em estudo verificamos que a grande maioria dos indivíduos (69,9%) apresentou raros LPMN em seus espécimes. Até quatro LPMN por campo foram encontrados em 13% dos indivíduos, de 6 a 10 por campo em 5,3% e 11,8% deles apresentaram numerosos LPMN por campo em suas amostras genitais (**Figura 17**). Nas amostras uretrais masculinas positivas para a infecção por *C. trachomatis* foi observado uma contagem acima de cinco LPMN em apenas 25% (n=6) (**Figura 18**). Na população feminina infectada o número de piócitos encontrado foi baixo uma vez que menos de cinco piócitos foram detectados nas quatro mulheres com a infecção (**Figura 18**). Este resultado reforça dados da literatura

mostrando que a infecção por *C. trachomatis* pode permanecer no hospedeiro de forma silenciosa e, assim, desta forma desenvolver seqüelas ao longo do tempo.

Um estudo avaliando a etiologia de uretrites não gonocócicas na Austrália em uma população de homens sintomáticos e assintomáticos mostrou que 68% dos homens infectados por *C. trachomatis* apresentaram cinco ou mais LPMN em amostras uretrais (Bradshaw et al., 2006). De forma semelhante, Haddow et al. (2004) avaliando o número de LPMN como um indicador de uretrite não gonocócica, relataram que apenas 63,3% dos homens infectados por *C. trachomatis* apresentaram cinco ou mais LPMN em amostras uretrais. Estes autores consideram que somente a pesquisa de número de LPMN em amostras uretrais não pode ser utilizada como um único indicador da infecção por *C. trachomatis*, uma vez que 36,7% dos homens positivos para a infecção apresentaram menos de cinco LPMN em seus espécimes clínicos. Este estudo demonstrou, então, que a avaliação do número de LPMN apresentou sensibilidade de 63,3% e especificidade de 76,6% frente à infecção. Seu valor preditivo positivo foi de somente 19,8%, embora o valor preditivo negativo tenha sido 95,9%.

No presente estudo foi detectado que 7,8% dos homens apresentam diplococos Gram-negativos nas amostras uretrais, sugestivos de *N. gonorrhoeae* (**Figura 16**). Assim como para as infecções por *C. trachomatis*, não existem dados sobre a freqüência das infecções por *N. gonorrhoeae* no Brasil. Entretanto, nos Estados Unidos é estimado que ocorram 600.000 novos casos desta infecção por ano, sendo a segunda infecção mais freqüente entre as doenças sexualmente transmissíveis, sobrepujada apenas pelas infecções por *C. trachomatis* (Ros et al., 2008). Da mesma forma que a infecção por *C. trachomatis*, a infecção por *N. gonorrhoeae* é uma importante causa de uretrite em homens. Nas mulheres é responsável por uretrites e cervicites e complicações como doença inflamatória pélvica que podem levar à infertilidade ou gravidez ectópica (Ros et al., 2008). A literatura mostra que a co-infecção entre estes dois agentes é muito comum (Van der Pol 2001; Kahn et al., 2005). Em nosso estudo encontramos uma (3,6%) co-infecção por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* na população masculina avaliada, demonstrando a importância de se realizar a triagem para ambos os microrganismos, uma vez que os sintomas quando estão presentes são semelhantes, como disúria, sangramento urogenital, dor pélvica e secreção vaginal ou uretral (Martin et al., 2000).

Uma característica comum das infecções por *C. trachomatis* é o quadro assintomático observado em 80% das mulheres e 50% dos homens infectados (Navarro et al., 2002; Boyadzhyan et al., 2004; Fernandez et al., 2005). Quando os sintomas aparecem, são vagos e inespecíficos, podendo manifestar-se sob a forma de disúria e corrimento uretral nos homens. Nas mulheres, a presença de corrimento vaginal e, ao exame ginecológico, a visualização de muco purulento ou turvo sendo drenado pelo orifício cervical, bem como o colo uterino com ectopia friável, sangrando facilmente, são sinais sugestivos de infecção pela *C. trachomatis* (Marques et al., 2007), embora não tenham sensibilidade e especificidade para firmar o diagnóstico (Marques et al., 2005). A ausência de sintomatologia característica representa uma enorme dificuldade para se estabelecer o diagnóstico da infecção clamidiana e a não intervenção para o seu controle e prevenção, contribuem para a manifestação das várias seqüelas que afetam o trato genital de homens e mulheres.

O questionário a que foram submetidos os homens e mulheres participantes do estudo foi composto por vários itens relativos a alterações observadas no trato genital. É importante deixar claro que várias outras infecções, além da infecção por *C. trachomatis* podem ser relacionados aos sinais e sintomas. Com isto em mente as respostas foram analisadas, inicialmente de maneira geral e, posteriormente, buscando uma relação com a infecção por *C. trachomatis*.

A grande maioria da população avaliada declarou pelo menos um sinal ou sintoma sugestivo de alterações no trato geniturinário (**Figuras 19 e 20**), representada por 81% deste grupo de estudo, homens e mulheres. Para os indivíduos masculinos sintomáticos foi observado que a queixa mais freqüente foi representada por corrimento uretral (70,7%), seguido de dor ao urinar (62,1%) e dor na relação sexual (15,5%) (**Figura 20**). Entre as mulheres, o corrimento vaginal foi mais freqüente (86%), seguido de dor pélvica (51,9%), dor na relação sexual (49,4%), odor fétido (47,8%), dor ao urinar (31,6%) e (20,3%) aborto (**Figura 19**). É importante ressaltar que estas queixas são relatadas com freqüência em vários estudos onde se pesquisa a presença de microrganismos sexualmente transmissíveis (Frias et al., 2001; Soares et al., 2003; Miranda et al., 2004; Sternak et al., 2006; Bakken et al., 2006; Geisler et al., 2006).



Analisando os sinais e/ou sintomas dos homens infectados por *C. trachomatis*, foi observado que o corrimento uretral e a dor ao urinar foram as manifestações clínicas mais comuns, correspondendo a 37,5% e 12,5%, respectivamente. Uma proporção significativa (29,2%) dos homens infectados relatou ambas as manifestações clínicas e um homem (4,2%) relatou a associação de dor ao urinar e dor na relação sexual. Um homem relatou a existência de três manifestações, corrimento uretral, dor ao urinar e dor na relação sexual (**Tabela 8**). Nossos resultados são semelhantes àqueles já observados em estudos realizados na Croácia (Sternak et al., 2006) e na Noruega (Baken et al., 2006) nos quais secreção uretral e dor ao urinar foram o sinal e sintoma mais comuns associados à infecção. No estudo realizado na Croácia foi determinada a frequência da infecção genital por *C. trachomatis* entre homens sintomáticos e assintomáticos, atendidos em um laboratório de saúde pública. Entre os homens sintomáticos, apresentando secreção uretral e/ou dor ao urinar, ocorreu uma maior frequência da infecção, representada por 18,5%, quando comparado com a população assintomática (3,3%).

Uma grande porcentagem da população feminina foi denominada sintomática (85,9%) (**Figura 19**). Nesta população apenas quatro mulheres apresentaram a infecção por *C. trachomatis*. Uma hipótese para este baixo número de mulheres infectadas por *C. trachomatis* seria o fato de as mulheres buscarem a consulta médica com uma frequência muito maior que os homens (**Figura 33**). É importante explorar de forma mais efetiva os resultados positivos em consequência da rotina de acompanhamento da saúde genital das mulheres (**Figura 32**), como este baixo resultado para a infecção por *C. trachomatis*. Na população infectada, uma das quatro pacientes relatou dor ao urinar e corrimento vaginal; e outra relatou a associação de três sinais e sintomas: corrimento vaginal, dor ao urinar e dor na relação sexual (**Tabela 7**)

Chamam a atenção duas das quatro mulheres infectadas que não mencionaram nenhum sinal ou sintoma, tendo, entretanto, relatado um histórico de aborto em suas vidas (**Tabela 7**). Uma destas pacientes mencionou ser o aborto recorrente sem causa aparente o motivo da investigação. Marques et al. (2007) relataram a presença de infecção por *C. trachomatis* em 17 casais (9% em homens 10% mulheres) que procuraram tratamento para infertilidade no ambulatório de esterilidade da Clínica Ginecológica do Hospital Agamenon Magalhães em Recife-

PE. A infecção por *C. trachomatis* em casais inférteis mostrou frequência elevada reforçando a importância de um rastreio rotineiro em clínicas de infertilidade, assim como nossos dados.

Estudos realizados por diferentes grupos brasileiros buscam estabelecer as manifestações clínicas mais comuns em mulheres infectadas por *C. trachomatis*. Desta forma, Miranda et al. (2004) estudaram a prevalência da infecção em uma população de adolescentes do sexo feminino no Município do Rio de Janeiro e observaram que 33,3% das adolescentes infectadas apresentaram dor pélvica e 17,8% secreção vaginal como sintomas geniturinários. Um estudo conduzido no Nordeste do Brasil, com o objetivo de estabelecer prevalência, morbidade e fatores de risco para infecções sexualmente transmissíveis em uma população feminina demonstrou que 6,8% das mulheres infectadas por *C. trachomatis* apresentaram sintomas de secreção vaginal e 10% de dor pélvica (Soares et al., 2003).

No presente estudo o número de mulheres infectadas por *C. trachomatis* não foi representativo para se avaliar a associação entre manifestação e/ou sintoma e a presença da infecção. Entretanto, devemos destacar que a grande maioria das mulheres avaliadas relatou sinais e/ou sintomas mesmo na ausência da infecção por *C. trachomatis*, sendo que 17,4% desta população feminina apresentaram vaginose bacteriana pelo método de Gram (**Figuras 13 e 14**).

Em nosso estudo verificamos que 24,7% dos homens não relataram nenhum sinal ou sintoma relacionado à alteração genital (**Figura 20**). Observamos que três indivíduos, 16% desta população assintomática e 12,5% da população total, foram diagnosticados positivos para a infecção por *C. trachomatis*. A característica de ausência de sinais e sintomas na infecção por *C. trachomatis* em homens tem sido relatada em vários estudos realizados em outros países (Mahony et al., 1992; Shillinger et al., 2005; Sternak et al., 2006; Mimiaga et al., 2008; Baud et al., 2008), com taxas variando de 1,2% a 6,1%. No Brasil, é do nosso conhecimento apenas um trabalho que aborda esta infecção de forma assintomática na população masculina. Em 2005, Fioravante et al. investigaram a frequência da infecção assintomática por *C. trachomatis* em homens recrutas militares no Município de Goiana-Goiás em 2005 tendo sido encontrada uma taxa de 5,0%.

Recentemente, o CDC tem recomendado triagem anual para *C. trachomatis* somente para jovens mulheres sexualmente ativas com idade inferior de 25 anos. No

caso de infecções é recomendado um novo teste, três a quatro meses depois da primeira triagem e tratamento, para diminuir a alta taxa de recorrência (Schillinger et al., 2005). Esta recomendação foi derivada da alta morbidade e graves seqüelas das infecções por *C. trachomatis* em mulheres e pelos benefícios advindos da triagem para reduzir as complicações, tais como a doença inflamatória pélvica.

A triagem universal em homens jovens não tem sido recomendada uma vez que os benefícios de triagens em homens jovens não terem, ainda, sido demonstrados (Joesoef et al., 2006). Entretanto, nosso estudo e outros citados anteriormente demonstram uma freqüência importante da infecção silenciosa por *C. trachomatis* (**Tabela 8**). Como proposto por outros autores, acreditamos que a triagem e o tratamento das infecções por *C. trachomatis* em homens sejam um fator determinante para reduzir o reservatório desta infecção na comunidade e, assim, diminuir a incidência e prevalência destas doenças, muitas vezes recorrentes em mulheres (Cheng et al., 2001; Schillinger et al., 2005; Joesoef et al., 2006). É impossível, portanto, continuar desconsiderando em nossos dias, a importância que infecção por *C. trachomatis* no trato genital de homens e mulheres desempenham, especialmente no período gestacional onde suas conseqüências possam comprometer o bem estar materno-fetal (Frias et al., 2001).

No Brasil, estudos abordando doenças sexualmente transmissíveis têm sido realizados em grupos selecionados como pacientes atendidos em clínicas de DST, trabalhadores do sexo, planejamento familiar e triagem em adolescentes (Soares et al., 2003; Santos et al., 2003; Lima et al. 2007). Tais grupos não representam a população de homens e mulheres do Brasil. Nosso estudo apresenta uma contribuição no conhecimento da epidemiologia de infecção por *C. trachomatis*, uma vez que são poucos trabalhos direcionados à clínica privada e principalmente pela carência de estudos sobre estas doenças na população masculina no Brasil.

Os fatores de risco associados à infecção por *C. trachomatis* estão, normalmente, relacionados a fatores como: aspectos do comportamento sexual dos indivíduos, como número de parceiros sexuais, o não uso de preservativos e histórico de DST, status sócio-econômico, idade e falta de acesso a serviço de prevenção e tratamento de DST (Navarro et al., 2002; Fioravante et al., 2005; Joesoef et al., 2006).

A Organização Mundial de Saúde e Programas de Nações Unidas em HIV/AIDS enfatiza o uso correto e consistente do preservativo masculino como a única medida disponível para reduzir a transmissão sexual de HIV e outras DST. Acreditam que clínicas de saúde devem orientar e chamar a atenção de seus pacientes sobre a importância do uso correto do preservativo masculino. Propõem que, em algumas demonstrações práticas, a enfermeira ou outro profissional da saúde possam oferecer uma breve sessão para jovens homens e mulheres e discutir a importância da utilização do preservativo demonstrando a técnica correta em um modelo de órgão genital masculino (Trigg et al., 2008).

Pesquisas realizadas em diversos centros têm demonstrado que a utilização de preservativo nas relações sexuais é um fator protetor contra a infecção por *C. trachomatis* (LaMontagne et al., 2003; Fioravante et al., 2005; Bakken et al., 2006). No presente estudo, o uso de preservativo masculino foi declarado por 53,2% da população masculina (**Figura 21**) e 14% da feminina (**Figura 23**). Entretanto o uso de preservativo não apresentou uma correlação com a ausência de infecção por *C. trachomatis*, uma vez que 54,2% dos homens infectados (**Figura 24**) e uma (25%) das quatro mulheres infectadas (**Figura 25**) declarou sua utilização. Resultado similar foi encontrado em uma população feminina por Araújo et al. (2006), que não detectou dados mostrando ser o uso consistente do preservativo um fator protetor contra a infecção. Estes autores levantam a possibilidade de a transmissão ocorrer durante as ações preliminares ao ato sexual, ou seja, anterior ao uso de preservativo. Entretanto é preciso considerar ainda que a pergunta do questionário possa não estar bem formulada, uma vez que não é indagado se o preservativo é utilizado em todas as relações sexuais, podendo haver relações desprotegidas, como observado por Frias et al (2001).

Na população feminina, observamos que 54,3% das mulheres fazem uso de algum método anticoncepcional (**Figura 22**). Entre estes, o mais utilizado é a pílula anticoncepcional, utilizada por 60,0% da população avaliada. Em seguida foi encontrado o DIU, utilizado por 20,0% das mulheres, seguido pelo preservativo, declarado por 14,0%, a seguir o anticoncepcional injetável (4,0%) e, finalmente, uma mulher (2,0%) relatou a laqueadura como método anticoncepcional (**Figura 23**). Desta forma, estes resultados demonstram que a população feminina está mais preocupada em evitar uma gravidez indesejável, não se preocupando com a as

infecções sexualmente transmissíveis, uma vez que apenas 14% da população feminina utilizam o preservativo em suas relações sexuais. Confirmando esta observação, verificamos que três das quatro mulheres apresentando a infecção por *C. trachomatis* declararam somente o uso de método contraceptivo, sendo duas método injetável e uma hormonal (**Figura 25**). Entretanto, é necessário observar que este também deve ser a idéia por trás da utilização do preservativo pela população masculina.

No presente estudo, verificamos uma ampla variação das idades na população de homens e mulheres que buscaram a pesquisa da infecção por *C. trachomatis* nas unidades do Instituto Hermes Pardini (**Figura 26**). Entretanto, a maior freqüência da infecção foi observada na faixa etária entre 18 e 30 anos que apresentou um total de 18 pessoas (64,3%) (**Figura 27**). Nossos dados estão de acordo com resultados de outros estudos mostrando que adolescentes e jovens adultos são os indivíduos mais afetados (Church et al., 2003; Joeseof et al., 2006; Baud et al., 2008; Satterwhite et al., 2008). Uma maior prevalência em jovens é, freqüentemente, atribuída ao comportamento sexual, ao número aumentado de parceiros sexuais. Além disso, sua imaturidade faz com que sejam menos conscientes sobre o uso correto do preservativo em todas as relações sexuais e menos abertos a conversas efetivas sobre sexualidade (Navarro et al., 2002). Em mulheres mais jovens um maior risco à instalação de *C. trachomatis* e outras infecções sexualmente transmissíveis pode estar associado a certos aspectos do desenvolvimento físico, como a persistência do epitélio colunar no endocérvix, que suporta o desenvolvimento de *C. trachomatis*, mudanças da microbiota vaginal e produção de muco. É possível ainda, que mulheres mais velhas possam adquirir imunidade parcial depois do início da atividade sexual. Entretanto, não se pode desconsiderar a presença de *C. trachomatis* nos demais grupos etários, pois mesmo em menor freqüência, em nosso estudo a infecção foi diagnosticada na população de 31 a 60 anos (**Figura 27**), o que pode se caracterizar como um reservatório e contribuir para a permanência da infecção na população.

A baixa escolaridade e o estado civil de solteiro são fatores de risco importante relacionado à infecção por *C. trachomatis*, bem como para outros microrganismos de transmissão sexual (Fioravante et al., 2005; Araújo et al., 2006; Yu et al., 2007; Machado et al. 2007). Uma observação interessante e contrária a estes parâmetros

está associada à escolaridade e ao estado civil da população avaliada. A escolaridade dos homens e mulheres participantes no estudo esteve representada por todos os níveis, tendo a maior população (51,5%), relatado ensino superior e a mais baixa (14,2%), apenas ensino fundamental (**Figura 28**). A avaliação dos níveis de escolaridade dos 28 indivíduos infectados por *C. trachomatis*, mostrou que 96,4% deles possuem, no mínimo, o ensino médio completo (**Figura 29**), sendo que 57,1% possuem o ensino superior, completo ou incompleto. Isto demonstra que a infecção por *C. trachomatis* não está presente apenas na população de baixa escolaridade. Acreditamos que a maior parte da população em estudo tem informação sobre as medidas de prevenção contra as doenças sexualmente transmissíveis. Estes dados indicam a necessidade de se enfatizar aos jovens a importância da utilização do preservativo como um protetor contra as DST, não só como um protetor contra uma gravidez indesejada.

Na população avaliada, as duas maiores populações se declararam solteiros (39,1%) e casados (43,2%) (**Figura 30**). Entretanto, como esperado, na população masculina auto-declarada solteira foi encontrado a maior população infectada (58,3%) (**Figura 31**). Este é um resultado esperado, pois acredita-se que indivíduos solteiros apresentem uma maior possibilidade de aquisição da infecção devido à maior atividade sexual com parceiros variados, ficando mais expostos a riscos de contaminação. Entretanto, a presença significativa da infecção entre as pessoas casadas (**Figura 31**) chama a atenção. Uma proporção de 33,3% dos homens, e 75% das mulheres, que se declararam casados estavam infectados (**Figura 31**). Estes resultados mostram que é importante dar orientações sobre medidas preventivas também direcionadas a casais com relações estáveis. O trabalho de prevenção com estes indivíduos, para que adotem o hábito de uso preservativo nas relações extraconjugais, já poderia ser o primeiro passo para o início da mudança de comportamento e assegurar a promoção da saúde e da atividade sexual com mais tranquilidade, visto que diminuiriam consideravelmente as chances de adquirir DST e HIV (Araújo et al., 2005).

As doenças sexualmente transmissíveis são agravos de grande importância para a saúde pública. Segundo a Organização Mundial da Saúde, estas doenças estão entre as dez principais causas de procura por serviços de saúde no mundo. Com o objetivo de verificar este aspecto na população avaliada, incluímos, no

questionário, um item sobre participação em planos de assistência médica privada. Desta forma, observamos que 91,1% da população de homens e mulheres em estudo possuem planos de saúde **(Figura 32)**. No entanto, esta característica não está associada à ausência de infecção por *C. trachomatis* **(Figura 34)** em especial população masculina, uma vez que 32,1% dos indivíduos apresentaram a infecção. Verificamos que 37,7% dos homens e 92,4% das mulheres relataram visitas anuais a urologistas e ginecologistas, respectivamente **(Figura 33)**. A taxa elevada na população feminina em estudo reforça a idéia de que mulheres vão com uma freqüência maior ao ginecologista para realizar exames periódicos e/ou em decorrência de alterações. Como consequência, realizaram exames laboratoriais com maior freqüência. Na população masculina, a consulta médica, na maioria das vezes, é decorrente da presença de manifestações clínicas, que no caso das infecções por clamídia, são mais freqüentes que nas mulheres sendo também mais sugestivas. Observamos que 60,7% dos homens infectados não realizam consultas anuais. Entretanto, as quatro mulheres infectadas por *C. trachomatis* relataram acompanhamento ginecológico anual **(Figura 35)**. É importante ressaltar que o acompanhamento médico anual de homens e mulheres não é o suficiente para o combate às infecções por *C. trachomatis* se a triagem não for realizada especialmente em adolescentes e jovens adultos, uma vez que a grande maioria das infecções é assintomática. Assim o diagnóstico e tratamento precoce serão fundamentais para evitar as graves seqüelas de longo prazo no trato genital masculino e feminino.

## VII- CONCLUSÕES

Os testes de PCR e de imunofluorescência direta utilizados neste trabalho para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* mostraram uma coincidência de 82,2%, entretanto, os testes de PCR utilizados mostraram uma melhor sensibilidade e especificidade que o teste de imunofluorescência direta.

O teste de PCR desenhado por nosso grupo demonstrou uma sensibilidade menor quando comparado com outro teste de PCR disponível na literatura, entretanto, sua especificidade foi superior. Desde modo, demonstrou um bom teste para ser utilizado no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*.

A alta frequência de infecções por *C. trachomatis* em homens (32,1%) em contraposição à baixa frequência em mulheres (4,3%) sugere a importância de um acompanhamento médico, bem como da triagem para as Doenças Sexualmente Transmissíveis, no combate destas infecções, menos comum em homens que em mulheres. Entretanto, a posse de planos de saúde não apresentou uma relação positiva com a proteção contra a infecção.

A grande maioria da população em estudo relatou algum sintoma genital, entretanto foi identificada a infecção sem nenhum sinal clínico em 12,5% da população masculina e em duas das quatro mulheres positivas, que, no entanto, relatam aborto. Estes dados confirmam uma característica relevante da infecção por *C. trachomatis*, o fato de permanecer assintomática, e assim, favorecer o seu agravamento no aparelho genital e disseminação para os parceiros do sexo.

Secreção uretral e dor ao urinar, foram os sinais e sintomas mais relatados pela população masculina com a infecção, mostrando que seu relato sugere a necessidade da pesquisa da infecção. Por outro lado, embora pequeno o número de mulheres infectadas, o aborto foi um dos quadros relatados por elas, confirmando dados da literatura que mostram ser esta uma importante seqüela da infecção.



Não foi possível encontrar uma relação de infecção por *C. trachomatis* e alteração da microbiota vaginal devido ao pequeno número de mulheres participantes do estudo e da população feminina infectada.

Como já descrito na literatura, a avaliação do número de leucócitos polimorfonucleares nos espécimes clínicos após coloração pelo método de Gram não pode ser utilizada como um fator de exclusão da infecção, uma vez que 78,6% dos indivíduos infectados apresentaram uma contagem inferior de cinco leucócitos polimorfonucleares por campo. Entretanto, pode ser útil como um indicador positivo da infecção, quando um número aumentado destas células é encontrado.

O perfil da população estudada difere da maioria de estudos disponível na literatura, pois a quase totalidade dos indivíduos possui plano de saúde e nível alto de escolaridade, 51,5% com nível superior. Entretanto, esta população, especialmente a masculina mostrou uma alta taxa (58,3%) da infecção por *C. trachomatis*.

Como esperado, a infecção, foi mais freqüente entre as pessoas mais jovens, no entanto, a importância da triagem para a infecção por *C. trachomatis* de maneira mais efetiva pode ser vista pela detecção da infecção em grupos de indivíduos pouco investigados, como homens acima de 25 anos, homens e mulheres casados e em indivíduos com nível mais alto de escolaridade.

O uso de preservativo na população masculina não se mostrou um fator protetor contra a infecção por *C. trachomatis*. Devido ao número limitado do uso de preservativo masculino na população feminina, fica evidenciado que as mulheres se preocupam mais em uma gravidez indesejável do que com alguma Doença Sexualmente Transmissível.

## VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrawal, S. K; Reddy, B. S; Bhalla, P; Kaur, H. Utility of Direct Fluorescent Antibody Test for detection of *Chlamydia trachomatis* and its detection in male patients with non gonococcal urethritis in New Delhi. **Indian Journal of Dermatology and Venereology and Leprology**. v.69, p.144-7 (2003).
- Alencar, A. A. F; Luiz C.L.F; Loureiro, J.A.S. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por imunofluorescência direta em esfregaços endocervicais. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**. v.103. p. 199-203. (1993).
- Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach DA, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **American Journal of Medicine**. v.74, p.14-22. (1983)
- An, Q; Radcliffe, G; Vassallo, R; Buxton, D; O'Brien, W.J; Pelletier, D.A; Weisburg, W.G; Klinger, J.D; Olive, D.M. Infection with a plasmid-free variant chlamydia related to *Chlamydia trachomatis* identified by using multiple assays for nucleic acid detection. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30. p. 2814-21. (1992).
- Araujo, R. S. C; Diogenes, S; Silva, R. M. Comportamento de homens com DST atendidos em unidades de saúde de referência de Fortaleza. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v.17. p.107-110. (2005).
- Araujo, R. S. C; Guimaraes, E. M. B. Fioravante, F.C.F. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brazil. **European Journal Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v.25, p. 397-400. (2006).
- Bagnoli, V.R; Fonseca, A.M, Halbe, H.W, Ramos, L.O; Pinotti, J.A. Infecção genital baixa por *Chlamydia trachomatis*. **Revista Brasileira de Medicina**. v.51. p.135-141. (1995).
- Bakken, I. J; Skjeldestad, F.E; Nordbo, Halvorsen, T.F; Thomassen, T; Storvold, G;Norbo, S.A. *Chlamydia trachomatis* among young norwegian men: sexual behavior and genitourinary symptoms. **Sexually Transmitted Diseases**. v.33, (2006).

- Bamberger, E. S; Siegler, E; Shiran, E.M; Patel, M.V; Steinberg, J.M; Gershtein, R; Srugo, I. *Chlamydia trachomatis* infections in female soldiers, Israel. **Emerging Infectious Diseases**. v.9. p.1344-6. (2003).
- Baud, D., Jaton, K; Bertelli, C; Kulling, J.P; Greub, G. Low prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic young Swiss men. **BMC Infectious Diseases**. v.8. (2008).
- Bhalla, P; Chawla, R; Garg, S; Singh, M.M; Raina, U; Bhalla, R; Sodhani, P. Prevalence of bacterial vaginosis among women in Delhi, India. **Indian Journal Medical Research**. v.125. p.167-72. (2007).
- Black C.M. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v.10. p.160-184. (1997).
- Boyadzhyan, B; Yashina, T; Yatabe, J.H; Patnaik, M; Hill, C.S; Comparison of the APTIMA CT and GC assays with the APTIMA combo 2 assay, the Abbott LCx assay, and direct fluorescent-antibody and culture assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42. p.3089-93. 2004.
- Bradshaw, C.S; Tabrizi, S.N; Read, T.R.H; Garland, S.M; Hopkins, C.A; Moss, L.M; Fairley, C.K. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. **Journal of Infectious Diseases**. v.193, p. 336-45. (2006).
- Budai, I.: *Chlamydia trachomatis*: milestones in clinical and microbiological diagnostics in the last hundred years: a review. **Acta Microbiologica Immunologica Hungarica**.v. 54, p. 5–22 (2007).
- Castro, C.R.C; Passos, M.R.L; Pinheiro, V.M.S. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em homens militares com queixas clínicas de uretrite. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente transmissíveis**. v.12. p. 4-11. (2000).
- CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Sexually transmitted diseases treatment guidelines**. v.51. p.32-36 (2002).
- Cevenini, R; Donati M; Sabri, V. *Chlamydia trachomatis* - the agent. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**. v.16. p. 761-773 (2002).

- Chen, C.Y; Chi, K.H; Alexander, S; Martini, I.M.C; Liu, H; Ison, C.A; Ballard, A.R; The molecular diagnosis of lymphogranuloma venereum: Evaluation of a Real-Time Multiplex Polymerase Chain Reaction Test using rectal an uretral specimens. **Sexually Transmitted Diseases**. v.33. (2006).
- Cheng, H; Macaluso, M; Vermund, S. H; Hook, E. W.: Relative accuracy of nucleic acid amplification tests and culture in detecting *Chlamydia* in asymptomatic men. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39. p. 3927-37 (2001).
- Chernesky, M; Jang, D; Luinstra, K; Chong, S; Smieja, M; Cai, W; Hayhoe; B; Portilho, E; MacRitchie, C; Main, C; Ewert, R. High analytical sensitivity and low rates of inhibition may contribute to detection of *Chlamydia trachomatis* in significantly more women by the APTIMA Combo 2 assay. **Journal Clinical of Microbiology**, v.44. p.400-5. (2006)
- Chitacumula, A.F; Noronha, E.F.B. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em homens assistidos no Centro de Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis da Prefeitura de Belo Horizonte. **Monografia apresentada no Departamento de Microbiologia**. (2007).
- Church, D. L; Zentner, A; Semeniuk, H; Henderson, E; Read, R.: Reasons for testing women for genital *Chlamydia trachomatis* infection in the Calgary region. **Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology**. v.14. p. 35–40 (2003).
- Coolen, M. J; Post, E; Davis, C; Forney, L.J. Characterization of microbial communities found in the human vagina by analysis of terminal restriction fragment length polymorphisms of 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71. p.8729-37. (2005).
- Cornetta Mda, C; Goncalves, A.K.S; Bertini, A.M. Efficacy of cytology for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10. p.337-40. (2006).
- Cunningham, K. A; Beagley, K. W. Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility. **Biology of Reproduction**. V. 79. p.180-9. (2008).

- Currie, M. J; Bowden; F. J. The importance of chlamydial infections in obstetrics and gynaecology: an update. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.47. p.2-8. (2007).
- Daoudi, F. H; Petit, J; Eb, F. Assessment of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic male partners of infertile couples. **Journal of Medical Microbiology**. v.53. p. 985-990. (2004).
- Darville, T. *Chlamydia trachomatis* infections in neonates and young children. **Seminars Pediatric Infectious Diseases**, v.16. p.235-44. (2005).
- Dean, D; Millman, K. Molecular and mutation trends analyses of omp1 alleles for serovar E of *Chlamydia trachomatis*. Implications for the immunopathogenesis of disease. **Journal of Clinical Investigation**. v. 99. p. 475-83. (1997).
- Demba, E; Morison, L; Loeff, M.S; Awasana, A.A; Gooding, E; Bailey, R; Mayaud, P; West, B. Bacterial vaginosis, vaginal flora patterns and vaginal hygiene practices in patients presenting with vaginal discharge syndrome in The Gambia, West Africa. **BMC Infectious Diseases**. v. 5. (2005).
- Dieterle, S. Urogenital infections in reproductive medicine. **Andrologia**. v.40. p.117-9 (2008).
- Donders, G. G. G. Definition and classification of abnormal vaginal flora. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.21. p.355-73. (2007).
- Donders, G. G .G; Vereecken, A; Bosmans, A.D; Salembier, G; Spitz, B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**.v.109, p.34-43. (2002).
- Everett, K. D. E.: *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. **Veterinary Microbiology**. v. 75. p. 109-126 (2000).
- Everett, K.D.E; Hornung, L.J. & Andersen, A.A. Rapid detection of *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests. **Journal of Clinical Microbiology** v.37, p. 575-580. (1999).

- Farencena, A; Camanducci, M. & Donati, M. Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks common plasmid and has properties of biovar trachoma. **Infection and Immunity**. v. 65, p. 2965-2969. (1997).
- Fernandez, R.N; Ximenes, A.C; Alves, M.F.C. Detecção do DNA de *Chlamydia trachomatis* em espondiloartropatias e artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v. 45.p.280-290. (2005).
- Fioravante, F. C; Alves, M.F.C; Guimaraes, E.M.B; Turchi, M.D; Freitas, H.A.G; Domingos, L.T. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic Brazilian military conscripts. **Sexually Transmitted Diseases**. v. 32, p. 165-9. (2005).
- Fletcher, R. H., Fletcher, S. W., Wagner, E. H. Epidemiologia Clínica. Porto Alegre, Artes Médicas, 3ª ed. (1991).
- Frias, M; Passos, M.R.L; Pinheiro, V.M.S. Prevalência de infecção pela *Chlamydia trachomatis* em mulheres não grávidas. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**. v.13, p. 5-22. (2001).
- Fukuda, E. Y; Lad, S. P; Mikolon, D.P; Martinez, I; Li, E. Activation of lipid metabolism contributes to interleukin-8 production during *Chlamydia trachomatis* infection of cervical epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.73. p.4017-24. (2005).
- Gao, X; Chen, X. S; Yin, Y.P; Zhong, M.Y; Shi, M.Q; Wei, W.H; Chen, Q; Peeling, R,W; Mabey, D. Distribution study of *Chlamydia trachomatis* serovars among high-risk women in China performed using PCR-restriction fragment length polymorphism genotyping. **Journal Clinical Microbiology**. v. 45. p. 1185-9. (2007).
- Gaydos, C. A; M. Theodore, M; Dalesio, N; Wood, B.J; Quinn, T.C. Comparison of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.4. p.3041-5. (2004).
- Gaydos, C. A; Ferrero, D. V; Papp, J. Laboratory aspects of screening men for *Chlamydia trachomatis* in the new millennium. **Sexually Transmitted Disease**. v.35, p.S45- S50. (2008).
- Geisler, W. M; Chow, J.M; Schacter, J; McCormack, W.M. Pelvic examination findings and *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic young women screened

- with a nucleic acid amplification test. **Sexually Transmitted Diseases**, v.34. p.335-8. (2006).
- George, J. A; Panchatcharam, T. S; Paramasivam, R.: Evaluation of diagnostic efficacy of PCR methods for *Chlamydia trachomatis* infection in genital and urine specimens of symptomatic men and women in India. **Jpn Journal Infectious Diseases**. v. 56, p. 88-92 (2003).
- Greer, L; Wendel, G.D. Rapid diagnostic methods in sexually transmitted infections. **Infectious Disease Clinics of North America**. V. 22. p. 601-17. (2008).
- Haddow, L. J., Bunn, A; Copas, A.J; Prince, M; Ridgway, G.L; Sadiq, S.T. Polymorph count for predicting non-gonococcal urethral infection: a model using *Chlamydia trachomatis* diagnosed by ligase chain reaction. **Sexually Transmitted Infection** v.80. p.198-200. (2004).
- Hammerschlag, M.R. Chlamydia and Chlamydiales: Beyond chlamydia trachomatis. **The Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 26; p.639-640. (2007).
- Hartley, J. C; Kaye, S; Stevenson, S; Bennett, J; Ridgway G. PCR detection and molecular identification of *Chlamydiaceae* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39. p.3072-9. (2001).
- Hogan, R.J;Mathews, S.A; Mukhopadhyay, S; Summersgill, J.T; Timms, P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. **Infection and Immunity**, v.72. p.1843-55. 2004.
- Horner, J. P; Radcliffe, C. K; Imtyaz Ahmed-Jushuf, I; Daniels, D; FitzGerald, M; Lazaro, N; McCarthy, G; Rooney, G. **UK National Guideline for the Management of Genital Tract Infection with *Chlamydia trachomatis*** (2006).
- Hsu, M. C, Tsai, P. Y, Chen, K.T; Li, L.H; Chiang, C.C; Tsai, J.J; Ke, L.Y; Chen, H.Y; Li, S.Y. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens in Taiwan. **Journal Medical Microbiology**. v. 55, p. 301-8. (2006).
- Hutchinson, K. B; Kip, K. E; Ness, R.B. Condom use and its association with bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated vaginal microflora. **Epidemiology**. v.18. p. 702-8. (2007).

- Hutchinson, K. B; Kip, K. E; Ness, R.B. Vaginal douching and development of bacterial vaginosis among women with normal and abnormal vaginal microflora. **Sexually Transmitted Diseases**. v.34. p. 671-5. (2007).
- Ison, C. A; Hay, P.E. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. **Sexually Transmitted Infectious**. v.78, n.6. p. 413-5. (2002).
- Jespersen, D. J; Flatten K. S; Jones, M.F; Smith, T.F. Prospective comparison of cell cultures and nucleic acid amplification tests for laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43. p.5324-6. (2005).
- Joesoef, M. R; Mosure, D.J. Prevalence of *Chlamydia* in young men in the United States from newly implemented universal screening in a national job training program. **Sexually Transmitted Diseases**, v.33. p.636-9. 2005.
- Jurstrand, M; Falk, L; Fredlund, H; Lindberg, M; Olcén, P; Andersson, S. Persson, K; Albert, J; Bäckman, A.: Characterization of *Chlamydia trachomatis* omp1 genotypes among sexually transmitted disease patients in Sweden. **Journal Clinical Microbiology**. v.39. p. 3915-19 (2001).
- Kahn, R.H; Mosure, D.J; Blank, S; Kent, C.K; Chow, J.M; Boudov, M.R; Brock, J; Tulloch, D.S. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* prevalence and coinfection in adolescents entering selected US juvenile detention centers, 1997–2002. **Sexually Transmitted Diseases**. v.32, p. p.255-259. (2005).
- Kouri, V; Cartaya, J; Rodriguez, M. E; Mune, M; Soto, Y; Resik, S. Bravo, J. Lip, A. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in human immunodeficiency virus-infected women in Cuba. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**. v.97. p.1073-7. (2002).
- Kucinskiene, V; Sutaite I; Valiukeviciene, S; Milasauskiene, Z; Domeika, M. Prevalence and risk factors of genital *Chlamydia trachomatis* infection. **Medicina (Kaunas)**, v.42, p.885-94. (2006).
- LaMontagne, D. S; Fine, D. N. Marrazzo, J. M. *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic men. **American Journal of Preventive Medicine**. v.24, p.36-42. (2003).



- Lan, J; Melgers, I; Meijer, C.J.L.M, Walboomers, J.M.M; Roosendal, R; Burger, C; Blecker, O; Van den Brule, A.J.C Prevalence and serovar distribution of asymptomatic cervical *Chlamydia trachomatis* infection as determined by highly sensitive PCR .**Journal of Clinical Microbiology**. v. 33. p. 3194-3197. (1995).
- Larsen, B; Monif, G. R. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. **Clinical Infectious Diseases**, v.32. p. 69-77. (2001).
- Lima, H. E; Oliveira, M. B; Valente, B.G; Afonso, D.A.A.F; Darocha, W.D; Souza, M.C.M; Alvim, T.C; Stancioli, E.F.B; Noronha, F.S.M . Genotyping of *Chlamydia trachomatis* From Endocervical Specimens in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, v.29. p.709-717. (2007).
- Lopéz. F.E *Chlamydia trachomatis*: **Biología e Manifestaciones clínicas Tratamientos, prevención y e técnicas diagnósticos de laboratorio**. Editora.CSEDOHC.(2004).
- Low, N., McCarthy, A; Macleod, J; Salisbury, C, Campbell, R; Roberts, T; Horner, P; Skidmore, S; Sterne, J; Sanford, E, Ibrahim, F; Holloway, A; Patel, R; Barton, P; Robison, S; Mills, N; Graham, A; Herring, A; Caul, E; Smigh, G.D; Hobbs, F; Ross, J; Egger, M. Epidemiological, social, diagnostic and economic evaluation of population screening for genital chlamydial infection. **Health Technology Assessment**. v.11. (2007).
- Mabey, D; Peeling; R. W. Lymphogranuloma venereum. **Sexually Transmitted Infectious**, v.78, p.90-2. (2002).
- Machado, A. C., Guimaraes, E. M.B; Sakurai, E; Fioravante, F.C.R; Amaral, W.N; Alves M.F. High titers of *Chlamydia trachomatis* antibodies in Brazilian women with tubal occlusion or previous ectopic pregnancy. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**. v.2007. (2007).
- Mahony, J. B; Luinstra, K. E. Sellors, J. W.Jang, D; Chernesky, M. A. Confirmatory polymerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from asymptomatic and symptomatic men. **Journal of Clinical Microbiology**. v.30. p.2241-45. (1992).
- Mahony, J. B; Luinstra, K. E; Sellors, J. W; Chernesky, M. A. Comparison of plasmid- and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting

- Chlamydia trachomatis* nucleic acids. **Journal Clinical Microbiology**. v.31. p. 1753-8. (1993)
- Marques, C.A.S; Menezes, M.L. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e esterilidade. **Jornal Brasileira de Doença Sexualmente Transmissíveis**. v.1. p. 66-70. (2005).
- Marques, C.A; Menezes, M.L.B; Coelho, I.M.G; Marques, C.R.C.M; Celestino, L.C; Melo, C.M; Lima, P.R. Infecção genital Por *Chlamydia trachomatis* em casais atendidos em ambulatório de esterilidade conjugal. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente transmissíveis**. v.19. p.5-10. (2007).
- Marrazzo, J. M; Ellen, J.M; Kent, C; Gaydos, C; Chappin, J; Dunne, E.F; Rietmeijer, C.A. Acceptability of urine-based screening for *Chlamydia trachomatis* to asymptomatic young men and their providers. **Sexually Transmitted Diseases**, v.33, (2006).
- Martin, D.H. Cammarata, C; Van Der Pol, B; Jones,Quinn, T.C. Gaydos, A.C; Charlotte, A.G; Crotchefelt, K. Schachter, J; Moncada, J; Junhking. Quin; T.T.C. Charlotte; A. Gaydos, Kimberly, C. Multicenter Evaluation of AMPLICOR and Automated COBAS AMPLICOR CT/NG Tests for *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal Clinical Microbiology**. v.31; p.1756-8. (2002).
- Matsumoto, A; Izutsu, H; Miyashita, N; Ohuchi, M.: Plaque formation by and plaque cloning of *Chlamydia trachomatis* biovar trachoma. **Journal of Clinical Microbiology**. v.36. p. 3013–3019 (1998).
- Medeiros, A. L. P. B; Lima, C. E. Q; Santana, E. M; Motta, D. L; Tashiro, T.: *Chlamydia trachomatis*: diagnóstico citológico e por imunofluorescência direta em uma amostra de mulheres do grande Recife. **Role Based Access Control**. v.39. p.43-6 (2007).
- Melles, H.H.B; Colombo, S; Linhares, I.M; Siqueira, L.F.G. Avaliação de parâmetros para o diagnóstico laboratorial de infecção genital feminina pela *Chlamydia trachomatis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.33. p. 355-61. (2000).

- Michelson, J; Boeno, A; Filho, E.V.C; Steibel, G; Berg, C; Torrens, M.C.T. Diagnóstico da infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis*. **Scientia Medica**, v.15, p.97-101. (2005).
- Miller, E.K; Diagnosis and treatment of *Chlamydia trachomatis* infection. **American Family Physician**, v.73. p.1411-6. (2006).
- Mimiaga, M. J; Mayer, K. H; Reisner, S.L; Gonzalez, A; Dumas, B; Vanderwarker, R; Novak, D,S; Bertrand,T. Asymptomatic gonorrhea and chlamydial infections detected by nucleic acid amplification tests among Boston area men who have sex with men. **Sexually Transmitted Diseases**. v. 35. p. 495-8. (2008).
- Miranda, A. E; Gadelha, A. M. J; Passos, M.R.L.: Impacto das infecções pela *Chlamydia trachomatis* na saúde reprodutiva. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**.v.15. p. 53-8 (2004).
- Miranda, A. E; Szwarcwald, C. L; Peres, R. L; Page-Shafer, K. Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a Population-Based of Female Adolescents in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**. v.31, p.542-46. (2004)
- Morré, S. A; Rozendaal, L; Valkengoed, I.G.M; Boeke, A.J.P; Vader, P.C.V; Schirm, J; Block, S; Hoek, J.A.R; Doornum, G.J.J; Meijer, C.J.L.M; Brule,A.J.C. Urogenital *Chlamydia trachomatis* serovars in men and women with a symptomatic or asymptomatic infection: an association with clinical manifestations? **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2292-6. (2000).
- Mossman, D; Beagley, K. W; Landay, A.L; Loewenthal, M; Ooi,C; Timms, P; Boyle, M. Genotyping of urogenital *Chlamydia trachomatis* in Regional New South Wales, Australia. **Sexually Transmitted Disease**. v. 35. p. 614-6. (2008).
- Murray, P.R; Rosenthal, K.S; Kobayashi, G.S & Pfaller, M.A. **Microbiologia Médica**. 4<sup>o</sup> edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. p.389-397. 2004.
- Navarro, C; Jolly, A; Nair, R; Chen, Y. Risk factors for genital chlamydial infection. **Canadian Journal of Infectious Diseases**. v.13. p.195-207. (2002).
- Ness, R. B; Kip, K. E; Hillier, S.L; Soper, D.E; Stamm, C.A. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. **American Journal of Epidemiology**. v.162. p. 585-90. (2005).

- Ness, R.B; Kip, E.K.; Hiler, S; Soper, D.F Stamm, C.A; Sweet, R.L; Rice, P; Richter, H.E. Bacterial Vaginosis (BV) and the risk of incident gonococcal or chlamydial genital infection in a predominantly black population. **Sexually Transmitted Diseases**. v.32. p.413-17. (2005)
- Newton, E. R; Piper J. M; Shain, R.N; Perdue, S.T; Peairs, W. Predictors of the vaginal microflora. **American Journal Obstetrics Gynecology**. v.184. p. 845-53. (2001).
- Nugent, R. P., Krohn, M. A; Hillier, S.L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 29. p. 297-301(1991).
- Numazaki, K; Wainberg, M.A; McDonald, J. *Chlamydia trachomatis* infections in infants. **Canadian Medical Association Journal**, v.140. p.615-22. (1989).
- Oliveira, F. A; Pflieger, V; Lang, K, Heukelbach, J; Miralles, I; Fraga, F; Sousa, A.Q; Meilicke, M.S; Ignatius, R; Kerr, L.F.S; Feldmeier, H. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.102. p. 751-6. (2007)
- Owen, M. K; Clenney, T.L. Management of vaginitis. **American Family Physician**, v.70, p.2125-32. (2004).
- Paavonen, J; Eggert-Kruse, W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. **Human Reproduction Update**, v.5. p.433-47. (1999).
- Page, L. A. Comparison of "pathotypes" among *Chlamydia* (psittacosis) strains recovered from diseased birds and mammals. **Journal of Wildlife Diseases**. v.3, , pp. 166-175. (1967).
- Pannekoek, Y;Westenberg, S. M;Eijk, P. P; Repping, S.van der Veen, F.van der Ende, A; Dankert, J. Assessment of *Chlamydia trachomatis* infection of semen specimens by ligase chain reaction. **Journal of Medical Microbiology**. v. 52. p.777-9. (2000).
- Peeling, R. W; Brunham, R. C. *Chlamydiae* as pathogens: new species and new issues. **Emerging Infectious Diseases**, v.2. p. 307-19. (1996).

- Pellati, D., Mylonakis, I, Bertoloni, G; Fiore, C; Andrisani, A; Ambrosini, G; Armanini, D. Genital tract infections and infertility. **European Journal Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**. v.140. p.3-11. (2008).
- Peterson, E. M; Markoff, B. A; Schachter, J; de la Maza, L. M.:The 7,5-kb plasmid present in *Chlamydia trachomatis* is not essential for the growth of this microorganism. **Plasmid** v.23: p.144–48 (1990).
- Porras, C; Safaeian, M; Gonzalez, P; M; Hildesheim, A; ; Silva, S; Schiffman, M; Rodriguez, A. C; Wacholder, S; Freer, E; Quint, K; Bratti, Espinoza, A; Cortes, B; Herrero, R. Epidemiology of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young women in Costa Rica. **Sexually Transmitted Diseases**. v. 35. p.461-468. (2008).
- Programa Nacional de DST e Aids. Prevalências e freqüências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde,– Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- v. 3. p.166–175. (1967).
- Rahangdale, L;Guerry, S;Bauer, H. M;Packel, L;RheW, M;Baxter, R;Chow, J; Bolan, G. An observational cohort study of *Chlamydia trachomatis* treatment in pregnancy. **Sexually Transmitted Diseases**. v.33. p.106-10. (2006).
- Reid, G; Bruce, A. W. Urogenital infections in women: can probiotics help? **Postgraduate Medical Journal**, v.79. p.428-32. (2003).
- Richardus, J. H; Gotz, H. M. Risk selection and targeted interventions in community based control of *Chlamydia*. **Current Opinion Infectious Diseases**, v.20. p.60-5. (2007).
- Rietmeijer, C. A; Hopkins, E; Hopkins, E; Geisler, W.M; Orr, D.P; Kent, C.K. *Chlamydia trachomatis* positivity rates among men tested in selected venues in the United States: a review of the recent literature. **Sexually Transmitted Disease**. v. 35. (2008).
- Ros, C. T; Schmitt, C.S. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. **Asian Journal Andrology**. v. 10. p. 110-4. (2008).

- Santos, C; Teixeira, F; Vicente, A; Filho, S.A. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7. p.91-5. (2003).
- Satterwhite, C.L; Joesoef, M.R; Datta, S.B; Weinstock, H. Estimates of *Chlamydia trachomatis* infections among men: United States. **Sexually Transmitted Diseases**. v.3. (2008).
- Schachter, J., Chow, J. M; Howard, H; Bolan, G; Moncada, J. Detection of *Chlamydia trachomatis* by nucleic acid amplification testing: our evaluation suggests that CDC-recommended approaches for confirmatory testing are ill-advised. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 2512-7. (2006).
- Schillinger, J. A; Dunne, E. F; Chapin, J. B; Ellen, J. M; Gaydos; C. A; Willard, N. J; Kent, C. K; Marrazzo, J. M; Klausner, J.D; Rietmeijer, C. A; Markowitz, L.E. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among men screened in 4 U.S. cities. **Sexually Transmitted Diseases**. V. 32. p. 74-7. (2005).
- Seadi, C.F; Rosseti, M.L. Diagnóstico laboratorial de *Chlamydia trachomatis*. **Caderno de Farmácia**. V.15, p.59-64. (1999).
- Seadi, F.C; Oravec, R; Poser, B.V; Cantarelli V.V; Rossetti M.L; Diagnóstico laboratorial pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.38. p.125-33. (2002).
- Singh, V; Salhan, S; das, B.C. & Mittal, A. Predominance of *Chlamydia trachomatis* serovars associated with urogenital infections in female in New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**. v 41. p. 2700-2702. (2003).
- Soares, V,L; Mesquita, A,M,T; Gazzaneo, T.C; Silva, Z.P; Hora, V; Diedrich, T; Silva, P.C; Melo, P.G; Dacal, A.R.C.D; Carvalho, M, F, C; Feldmeier. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east-Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. **Tropical Medicine and International Health**. v.8, p.595-603. (2003).
- Solomon, A. W; R. W. Peeling, Foster, A; Mabey, D.C.W. Diagnosis and assessment of trachoma. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17. p.982-1011. (2004).

- Spaargaren, J; Fennema, H.S.A; Morr , S.A; Vries, H.J.C; Coutinho, R.A. New lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* variant, Amsterdam. **Emerging Infectious Diseases**, v.11. p.1090-2. (2005).
- Spiliopoulou, A; V. Lakiotis, Vittoraki, A; Zavou, D; Mauri, D. *Chlamydia trachomatis*: time for screening? **Clinical Microbiology Infectious Diseases**, v.11. p.687-9. (2005).
- Sternak, S.L; Kruzic, V; Cavlek, T.V; Skerk, V. *Chlamydia trachomatis* infection in Croatian symptomatic and asymptomatic men. **The Journal of Men's Health & Gender**. v 3, p.80-1. (2006)
- Stothard, D.R; Williams, J.A; Van Der Pol, B; Jones, R.B. Identification of a *Chlamydia trachomatis* serovar E urogenital isolate which lacks the cryptic plasmid. **Infection and Immunity**. V. 66. p. 6010-13.(1998).
- Swain, F. R; McDonald, R.A; Pfister, J.A; Gradus, M.E; Sedmak, G.V. Singh, A.S. Decision Analysis: Point-of-care *Chlamydia trachomatis* testing vs. Laboratory-based methods. **Clinical Medicine & Research**. v.2. p.29-35. (2003).
- Thomas, N.S; Lusher, M; Storey, C.C; Clarke, I.N. Plasmid diversity in *Chlamydia*. **Microbiology**. v.143. p. 1847-54. (1997).
- Trigg, B. G; Kerndt, P. R; Aynalem, G. Sexually transmitted infections and pelvic inflammatory disease in women. **Medical Clinics of North America**. v.92, p.1083-113. (2008)
- Unemo, M; Olc n, P; Agn -Stadling, I; A Feldt, A; Jurstrand, M; B Herrmann, B; Persson, K; Nilsson, P; Ripa, T; Fredlund, H.: Experiences with the new genetic variant of *Chlamydia trachomatis* in  rebro county, Sweden - proportion, characteristics and effective diagnostic solution in an emergent situation. **European Surveillance**. v. 12. p. 5-6 (2007).
- Van der Pol, B; Ferrero, D.V; Barrington, L.B; Hook III, E; Lenderman, C; Quinn, T; Gaydos, C; Lovchik, J; Schachter, J; Moncada, J; Hall, G; Tuohy, M.J; Jones, R.B. Multicenter Evaluation of the BDProbeTec system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and urethral swabs. **Journal of Clinical Microbiology**.v. 39. p.1008-16. (2001).

- Varella, R.Q; Passos, M.R.L; Pinheiro, V.M.S; Lopes, H.R; Santos, S.B; Guimarães, C.C; DeAngelis, F. Pesquisa de *Chlamydia trachomatis* em mulheres do município de Piraí-Rio de Janeiro. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis** v.12 (Supl): p.1-18. (2000).
- Vasquez, A; Jakobsson, T; Ahrné, S; Forsum, U; Molin, G. Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40. p. 2746-9. (2002).
- Vaz, F.A.C; Ceccon, M.E.J; Diniz, E.M.A. Infecção por *Chlamydia trachomatis* no período neonatal: aspectos clínicos e laboratoriais. Experiência de uma década: 1987-1998. **Revista da Associação Médica Brasileira**. V. 45. p.303-311. (1999).
- Veldhuijzen, I.K; Bergen, J.E.A.M; Gotz, H.M; Hoebe, C.J.A; Morré, S.A; Richardus, J.H. Reifections, persistent infectious, and new infectious after general population screening for *Chlamydia trachomatis* infection in the Netherlands. **Sexually Transmitted Diseases**, v.32. p.599-604.2006.
- Verstraelen, H; Verhelst, R; Roelens, K; Claeys, G; Weyers, S; De Backer, E; Vaneechoutte, M; Temmerman, M. Modified classification of Gram-stained vaginal smears to predict spontaneous preterm birth: a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** v..196. p.528,1-6. (2007).
- Villareal, C; Whittum-Hudson, J. A; Hudson, A. P. Persistent *Chlamydiae* and chronic arthritis. **Arthritis Research**, v.4. p.5-9. (2001).
- Vitali, B; Pugliese, C, Pugliese, Biagi, E; Candela, M; Turrone, S; Bellen, G; Donders, G.G.G; Brigidi, P. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73. p. 5731-41. (2007).
- Welsh, L. E;Quinn, T. C;Gaydos, C. A. Influence of endocervical specimen adequacy on PCR and direct fluorescent-antibody staining for detection of *Chlamydia trachomatis* infections. **Journal of Clinical Microbiology**. v.35, p. 3078-81. (1997).



- Wiesenfeld, H. C; Hillier, S. L; Krohn, D.V; Swet, R.L. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. **Clinical Infectious Diseases**, v.36. p.663-8. (2003).
- Xiong, L; Kong, F; Zhou H; Gilbert, G.L. Use of PCR and reverse line blot hybridization assay for rapid simultaneous detection and serovar identification of *Chlamydia trachomatis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44. p.1413-8. (2006).
- Yu, M. C; Li, L. H; Li, S.Y; Tang, L.H; Tai, Y; Chen, K.T. Molecular epidemiology of genital chlamydial infection among male patients attending an STD clinic in Taipei, Taiwan. **Sexually Transmitted Diseases**. v.34. p.570-3. (2007).
- Zarakolu, P; Yagci, S; Çakir, B; Unal, Serthat. Screening for *Chlamydia trachomatis* infection using direct fluorescein antibody method in female sex workers registered in Ankara, Turkey: Prons and cons. **Turkish Journal of Medical Sciences**. v.38. p.1-3. (2008).
- Zhou, X; Bent, S. J; Schneider, M.G; Davis, C.C; Islam, M.R; Forney, L.J.Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. **Microbiology**, v.150, p.2565-73. (2004).

## Consentimento para Participação dos Pacientes

### TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA

Prezado(a) cliente,

Você foi selecionado (a) para participar de uma pesquisa por ser cliente do Instituto Hermes Pardini.

O objetivo deste estudo é, em primeiro lugar, avaliar um teste para diagnóstico da infecção por *C. trachomatis*, infecção que pode trazer vários incômodos e seqüelas para as pessoas infectadas. Este estudo nos permitirá também determinar a frequência deste microrganismo na população de Belo Horizonte.

Sua participação nesse estudo é completamente voluntária. Caso concorde em participar da pesquisa, precisaremos usar amostras de secreção, além de consultar os dados de seu prontuário. Será preservado o sigilo dos dados. *Caso você não queira participar do estudo, sinta-se livre para fazê-lo, em qualquer época, e sem nenhum prejuízo para você.*

Se você necessitar de mais esclarecimentos a respeito desta pesquisa, por favor, entre em contato com a Profa. Fátima Soares Motta Noronha (Profa. Associada da Universidade Federal de Minas Gerais) pelo telefone (031) 3499-2756.

**Eu, \_\_\_\_\_, concordo em participar do estudo acima.**

\_\_\_\_\_  
**Paciente- Assinatura**

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_

## Questionário para o sexo feminino

Perguntas para serem respondidas pela paciente:

1- Nome: \_\_\_\_\_

2- Idade: \_\_\_\_\_

3- Estado Civil:  Solteiro  Casado  Divorciado  Outros

4- Escolaridade/Profissão: \_\_\_\_\_

1º Grau incompleto  1º Grau completo  2º Grau incompleto

2º Grau completo  Superior incompleto  Superior completo  Pós- graduação

5- Bairro que reside: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

6- Possui plano de saúde:  Sim  Não

7- Qual é o motivo da coleta?

---

Outras questões

8- Usa algum método anticoncepcional?(oral, injetável, preservativo, DIU, etc).

Sim  Não Qual? \_\_\_\_\_

9- Tem filhos?  Sim  Não Quantos? \_\_\_\_\_

10- Já sofreu aborto?  Sim  Não. Quantos? \_\_\_\_\_

11- Faz acompanhamento ginecológico anual?  Sim  Não

12- Apresenta dor região pélvica?  Sim  Não

13- Sente dor ao urinar?  Sim  Não

14- Tem corrimento vaginal?  Sim  Não

15- Apresenta odor forte?  Sim  Não

16- Sente dor durante relação sexual  Sim  Não

Observações a serem feitas pelo profissional de saúde:

---

## Questionário para o sexo masculino

Perguntas para serem respondidas pelo paciente:

1- Nome: \_\_\_\_\_

2- Idade: \_\_\_\_\_

3- Estado Civil:  Solteiro  Casado  Divorciado  Outros

4- Escolaridade/Profissão: \_\_\_\_\_

1º Grau incompleto  1º Grau completo  2º Grau incompleto

2º Grau completo  Superior incompleto  Superior completo  Pós- graduação

5- Bairro que reside: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

6- Possui plano de saúde:  Sim  Não

7- Qual é o motivo da coleta?

\_\_\_\_\_

Outras questões:

8- Faz uso de preservativo nas relações sexuais?  Sim  Não

9- Sente dor ao urinar?  Sim  Não

10- Tem corrimento uretral?  Sim  Não

11- Sente dor durante a relação sexual?  Sim  Não

12- Faz acompanhamento urológico anual:  Sim  Não

Observações a serem feitas pelo profissional de saúde:

\_\_\_\_\_