



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO ALFREDO DA MATTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A DERMATOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL**



**DETECÇÃO DE *Chlamydia trachomatis* E *Neisseria gonorrhoeae*,
POR qPCR MULTIPLEX, EM MULHERES, ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO
ALFREDO DA MATTA (FUAM)**

EMILY AGATHA DE MOURA COUTEIRO

**MANAUS
2020**

EMILY AGATHA DE MOURA COUTEIRO

**DETECÇÃO DE *Chlamydia trachomatis* E *Neisseria gonorrhoeae*,
POR qPCR MULTIPLEX, EM MULHERES, ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO
ALFREDO DA MATTA (FUAM)**

Orientador (a): **Profº Dr. Milton Ozório Moraes**

Co-orientador (a): **Profª Dra. Fabíola da Costa Rodrigues**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Aplicadas à Dermatologia,
da Universidade do Estado do
Amazonas, em Convênio com a
Fundação Alfredo da Matta, para o
título de Mestre no curso de
Mestrado Profissional.

MANAUS

2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

C871d	Couteiro, Emily Agatha de Moura Detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, por qPCR Multiplex, em mulheres, atendidas na Fundação Alfredo da Matta (FUAM) / Emily Agatha de Moura Couteiro. Manaus : [s.n], 2020. 70 f.: color.; 29 cm. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia - Mestrado Profissional - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2020. Inclui bibliografia Orientador: Moraes, Milton Ozório Coorientador: Rodrigues, Fabíola da Costa 1. C. trachomatis. 2. N. gonorrhoeae. 3. Diagnóstico molecular. 4. Sensibilidade. 5. Especificidade. I. Moraes, Milton Ozório (Orient.). II. Rodrigues, Fabíola da Costa (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título
-------	---

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Gráfico 1 - Notificação de casos de pacientes infectados com clamídia e gonorreia na Fundação Alfredo da Matta, no período de 2005 à 2018.....	3
Gráfico 2 - Frequência das doenças clamídia e gonorreia em mulheres atendidas na Fundação Alfredo da Matta, em Manaus, Amazonas	33
Gráfico 3 - Representação dos tipos de corrimento associado aos resultados do teste de qPCR multiplex <i>in house</i>	33
Gráfico 4 - Diagnóstico de <i>C.trachomatis</i> e <i>N.gonorrhoeae</i> por qPCR multiplex <i>in house</i> baseado na ausência de corrimento das participantes do estudo.....	34
Gráfico 5 - Número de casos infectados com <i>C.trachomatis</i> e <i>N.gonorrhoeae</i> associadas à outras IST.....	35
 Figura 1 - Ciclo de vida <i>Chlamydia trachomatis</i>	4
Figura 2 - Fluxograma da metodologia utilizada para otimização do teste molecular qPCR multiplex para amplificação dos alvos PC (<i>C.trachomatis</i>) e <i>porA</i> (<i>N.gonorrhoeae</i>).....	21
Figura 3 - Amplificação da curva padrão de DNA do agente etiológico <i>C.trachomatis</i> , obtidos pelo ensaio de qPCR <i>in house</i>	26
Figura 4 – Curva padrão de <i>C.trachomatis</i> com os pontos e limites de detecção da quantidade de DNA, e seus respectivos Cts	26
Figura 5 - Amplificação da curva padrão do agente etiológico <i>N.gonorrhoeae</i> , obtidos pelo ensaio de qPCR <i>in house</i>	27
Figura 6 – Curva padrão de <i>N.gonorrhoeae</i> com os pontos e limites de detecção da quantidade de DNA, e seus respectivos Cts	28
Figura 7 - Árvore de classificação para diagnóstico molecular de <i>C.trachomatis</i> e <i>N.gonorrhoeae</i>	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes métodos moleculares de diagnósticos para detecção de IST e suas respectivas características	13
Tabela 2 - Oligonucleotídeos dos iniciadores e sonda dos alvos plasmídeo críptico e <i>porA</i>	19
Tabela 3 - Oligonucleotídeos dos iniciadores e sonda do alvo ACT (β -actina)	20
Tabela 4 - Sete pontos de diluições da curva padrão de <i>C.trachomatis</i> (Gblock) e <i>N.gonorrhoeae</i> (ATCC19424), e os respectivos valores de Ct obtidos por qPCR multiplex <i>in house</i>	25
Tabela 5 - Concentrações finais dos pares de iniciadores dos alvos Plamídeo Críptico e <i>porA</i> , para a padronização da reação em duplex	28
Tabela 6 - Concentrações dos pares de iniciadores do gene ACTB (β -actina) para a padronização da reação, em tríplex	29
Tabela 7 - Cálculos avaliados para verificar a exatidão da técnica de qPCR multiplex	31
Tabela 8 - Características comportamentais das 178 recrutas em um centro de referência no Amazonas, Brasil, 2019.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DST	Doenças sexualmente transmissíveis
S	Sensibilidade
E	Especificidade
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
ATP	Adenosina tri-fosfato
CE	Corpúsculo elementar
CR	Corpúsculo reticular
MOMP	<i>Major outer membrane protein</i>
pb	Pares de base
pg	Picogramas
ng	Nanogramas
r²	Coeficiente de determinação
LOS	Lipoligossacarídeos
TNF	Fatores de necrose tumoral
PC	Plasmídeo Críptico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
R\$	Real
LCR	Reação em cadeia da ligase
DAS	Amplificação por deslocamento de cadeia
ARV	Medicamento antirretrovirais
g	Grama
ACTB	βeta actina
CNS	Conselho Nacional de Saúde
Nº	Número
°C	Grau celsius
nM	Nanomolar
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Nm	Nanômetro
%	Porcento
US \$	Dólar

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHII CT-ID	Teste molecular por Captura Híbrida
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Imunoensaio Enzimático
EUA	Estados Unidos da América
FDA	Food and Drug Administration
FUAM	Fundação de Dermatologia e Venereologia Alfredo da Matta
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	Intervalo de Confiança
IGD	Infecção Gonocócica Disseminada
IST	Infecção Sexualmente Transmissível/Infecções Sexualmente Transmissíveis
K	Índice Kappa
LGV	Linfogranuloma Venéreo
NAATs	Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
DAS	Amplificação por Deslocamento da Fita
SUS	Sistema Único de Saúde
TLCE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VPN	Valor preditivo negative
VPP	Valor preditivo positive

RESUMO

As infecções sexualmente transmissíveis causadas por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* tem se tornado um problema crescente em saúde pública. A Clamídia e a gonorreia, são consideradas doenças que podem acometer ambos os sexos, em indivíduos sexualmente ativos, principalmente jovens. Mesmo após a contaminação causada por esses patógenos, muitas mulheres permanecem assintomáticas, dificultando o diagnóstico e o tratamento adequado. O isolamento em meio de cultura, utilizado no diagnóstico laboratorial tem sido considerado “padrão-ouro”, no entanto, a detecção do material genético por técnicas de PCR e PCR em tempo real (qPCR), é mais sensível e específica. O objetivo deste estudo foi padronizar um sistema de qPCR multiplex como método de detecção das bactérias *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, em mulheres sintomáticas e assintomáticas, atendidas na Fundação Alfredo da Matta. Foram coletadas amostras endocervicais, utilizando escova endocervical do Kit DNA Hybrid Capture 2HPV e CT/GC, de 179 pacientes do sexo feminino, acima de 18 anos, divididas em dois grupos, um com sintomas sugestivos de clamídia e gonorreia, e outro com mulheres assintomáticas cujos parceiros apresentaram corrimento uretral. Para a extração de DNA, utilizou-se o Kit Dneasy Blood & Tissue (QIAGEN), seguida da padronização de reação da técnica de PCR em tempo real multiplex. Os limites de detecção do ensaio obtidos na curva padrão realizada, foram: Ct (*cycle threshold*) de 35,7 para *C.trachomatis*, correspondendo à um limite de de 14,2 cópias do DNA alvo e Ct de 36,6 para *N.gonorrhoeae*, correspondendo à um limite de de 22,6 cópias do DNA alvo. Para a avaliação do desempenho desse ensaio qPCR multiplex *in house* utilizou-se um painel de amostras de DNA analisadas por Kit comercial (LightCycler multiplex DNA master, da Roche Life Science). Esse painel consistia em amostras positivas para *N.gonorrhoeae*, positivas para *C.trachomatis* e negativas para ambas. A sensibilidade observada para o ensaio foi de 92,5% e 100% e a especificidade de 100% e 94,4% para *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, respectivamente. Neste contexto, o teste de qPCR multiplex *in house*, apresentou uma ótima eficácia no rastreamento das infecções causadas por estas IST, sendo capaz de detectar a presença dos patógenos, em indivíduos independente dos sinais e sintomas. Devido o desempenho do teste, sugere-se a adoção desta metodologia na rotina de diagnóstico clínico-laboratorial da clínica de IST da FUAM.

Palavras chave: *C.trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, diagnóstico molecular, sensibilidade e especificidade.

ABSTRACT

Sexually transmitted infections caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*, have become an increasing problem in public health. Chlamydia and gonorrhea are considered diseases that can affect both sexes, in sexually active individuals, especially young people. Even after contamination caused by these pathogens, many women remain asymptomatic, making diagnosis and proper treatment difficult. The isolation in culture medium, used in the laboratory diagnosis has been considered “gold standard”, however, the detection of genetic material by PCR and PCR techniques in real time (qPCR), is more sensitive and specific. The objective of this study was to standardize a multiplex qPCR system as a method of detecting the bacteria *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*, in symptomatic and asymptomatic women, attended at Fundação Alfredo da Matta. Endocervical samples were collected using the DNA Hybrid Capture 2HPV and CT / GC endocervical brush from 179 female patients, over 18 years old, divided into two groups, one with symptoms suggestive of chlamydia and gonorrhea, and the other with asymptomatic women whose partners had urethral discharge. For DNA extraction, the Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) was used, followed by the reaction standardization of the multiplex real-time PCR technique. The detection limits of the assay obtained in the standard curve performed were: Ct (cycle threshold) of 35.7 for *C. trachomatis*, corresponding to a limit of 14.2 copies of the target DNA and Ct of 36.6 for *N. gonorrhoeae*, corresponding to a limit of 22.6 copies of the target DNA. To assess the performance of this in house multiplex qPCR assay, a panel of DNA samples analyzed by a commercial kit (*LightCycler multiplex DNA master, from Roche Life Science*) was used. This panel consisted of samples positive for *N.gonorrhoeae*, positive for *C. trachomatis* and negative for both. The sensitivity observed for the assay was 92.5% and 100% and the specificity was 100% and 94.4% for *C. trachomatis* and *N.gonorrhoeae*, respectively. In this context, the in house multiplex qPCR test showed excellent efficacy in tracking infections caused by these STIs, being able to detect the presence of pathogens, in individuals regardless of signs and symptoms. Due to the performance of the test, it is suggested the adoption of this methodology in the routine of clinical-laboratory diagnosis of the STI clinic of FUAM.

Keywords: *C.trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, molecular diagnosis, sensitivity and specificity.

RESUMO LEIGO

As infecções sexualmente transmissíveis (IST), são infecções causadas por vírus, bactérias ou outros microorganismos e transmitidas principalmente por meio do contato sexual (oral, vaginal e anal) sem o uso de preservativo. A clamídia e a gonorreia são infecções causadas pelas bactérias *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, respectivamente. São infecções encontradas frequentemente em centros de referência, podendo afetar ambos os sexos, além de serem transmitidas da mãe para o feto. Nas mulheres, se apresentam de forma assintomática, podendo propagar ainda mais a infecção para outras pessoas. Quando sintomáticas, podem apresentar corrimento vaginal, desconforto abdominal, dor ao urinar, anormalidades no ciclo menstrual e outras complicações. Nos homens, pode provocar sintomas como: dor ao urinar, secreção purulenta (com pus), ardência e vermelhidão/inflamação. O tratamento de ambas infecções é realizado com antibióticos, no entanto, quando não tratadas precocemente, podem apresentar diversas complicações. As complicações que mais acometem mulheres por *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, são doença inflamatória pélvica (DIP) e infertilidade, podendo provocar dores abdominais, corrimento vaginal e sangramento irregular. Por esse motivo, este estudo teve por objetivo padronizar um teste molecular eficaz, com o intuito de auxiliar os profissionais da saúde, no diagnóstico dessas infecções em mulheres, já que na maioria dos casos elas não apresentam sintomas da infecção. Para a realização do estudo, foram utilizadas 178 amostras de mulheres com idade entre 18-56 anos, que fizeram atendimento no setor de IST da FUAM. O teste molecular qPCR multiplex *in house*, apresentou resultados satisfatórios, capazes de detectar as bactérias *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* ao mesmo tempo, e dessa forma, contribui no diagnóstico e tratamento precoce, reduzindo a transmissão dessas doenças.

ATA DE DEFESA



ATA DA AULA DE DEFESA DE
MESTRADO, DA ALUNA **Emily Agatha de Moura Couteiro** DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS APLICADAS À DERMATOLOGIA.

Data, Hora e Local: No dia trinta de julho do ano de dois mil e vinte, às 09 horas, realizou-se, por meio de Webconferência, a **Defesa** do (a) aluno (a) **Emily Agatha de Moura Couteiro**, sob o título "**Detecção de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, por QPCR Multiplex em mulheres atendidas na Fundação Alfredo da Matta**", como parte dos requisitos exigidos para a defesa do curso de *Mestrado em Ciências Aplicadas à Dermatologia*. Foi avaliada a capacidade do (a) aluno (a) em comunicar verbal e visualmente o projeto de pesquisa. O (a) discente teve como orientador (a) Professor (a) Doutor (a) Milton Ozorio Moraes, segundo encaminhamento da Professora Dra. Carolina Chrusciak Talhari Cortez, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas. A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros: Professora Doutora Carolina Chrusciak Talhari Cortez e Professor Doutor Felipe Gomes Naveca. Encerrando os trabalhos, os examinadores deram o parecer final sobre a aula, tendo sido atribuído (a) ao (a) aluno (a) o conceito discriminado no parecer da referida banca.

Professor Dr. Milton Ozorio Moraes
FIOCRUZ/FUAM

Professora Dra. Carolina Chrusciak Talhari Cortez
FUAM/UEA/AM

Dr. Felipe Gomes Naveca
FIOCRUZ/AM



DEDICATÓRIA

Dedico à meus pais Marco Polo do Nascimento Couteiro e Sulamita Santos de Moura Couteiro (In memoriam) e a minha avó Guilhermina do Nascimento Couteiro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus e a Nossa Senhora, pelo dom da vida e por me darem a fé e a força necessária para lutar e enfrentar todos os obstáculos durante minha trajetória acadêmica.

Ao meu pai, pelo incentivo e confiança em me tornar uma excelente Mestre. E à minha mãe, que sempre me incentivou à ir atrás dos meus sonhos e lutar pelas minhas vitórias. E onde quer que esteja, sei que estará me guiando e iluminando em cada etapa nova da vida.

Ao meu noivo Arimar Evangelista da Costa Júnior, pelo total apoio, compreensão e companheirismo durante a realização desta dissertação.

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA), assim como a Fundação Alfredo da Matta (FUAM), que proporcionou estruturas de qualidade, dando suporte em qualquer atividade realizada durante todo o meu percurso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela oportunidade de bolsa oferecida e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao meu orientador Prof^o Dr^o Milton Ozório Moraes, pela exigência no cumprimento das etapas, apoio e principalmente, por ter aceitado me orientar. É uma honra ser orientada por um pesquisador ao qual admiro.

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Fabíola da Costa Rodrigues, pela discussão de ideias durante a escolha e desenvolvimento da pesquisa, contribuindo para o meu crescimento científico e intelectual.

Aos meus professores doutores do programa de Pós-graduação da UEA, que me estimularam e inspiraram nessa caminhada profissional, além de me proporcionarem conhecimentos fundamentais em diversas áreas da saúde.

Aos meus amigos e parceiros do laboratório de biologia molecular Msc. André Luiz Leturiondo, Msc. Cynthia de Oliveira Ferreira, Msc. Camila Gurgel dos Santos e Msc. Ariani Batista Noronha, pelo voto de confiança, pelo apoio e incentivo de novos títulos no futuro, além do compartilhamento de conhecimentos e momentos de

descontração, ao qual levarei para o resto da minha vida. Sem a ajuda de toda esta equipe, a conclusão desta pesquisa não seria possível.

À todo o setor de IST da FUAM, ao qual pude criar laços de amizade, mas principalmente pela oportunidade de realizar a etapa inicial desta pesquisa, que foi a coleta de amostras em mulheres, especialmente a médica ginecologista, Dr^a Flávia de Jesus Padilha, por dividir conhecimentos médicos sobre as doenças clamídia e gonorreia, assim como outras IST. E também, as enfermeiras Ana Cláudia, Lucília, Maria de Lourdes e as técnicas Ocirema, Nágila, Jôcelma e Waldeíza.

Às amigas Dejanane Silva, Lucilene Sales e Viviane Kici, com quem compartilhei tantas emoções, preocupações e aflições durante este árduo percurso acadêmico, pelas trocas de conhecimentos e experiências adquiridas, abraços, risos, conselhos e por terem me acolhido com tanto carinho. São amizades, que serão gravadas em meu coração e que pretendo levar para toda a minha vida. Assim como toda a minha turma do mestrado, que se tornou unida do início ao fim.

Ao Jamile Junior e Júlio Sampaio, pela disponibilidade em me dar todo o suporte necessário para organização e realização deste trabalho, bem como auxílio na compilação dos dados, e na oportunidade de estudo através dos livros.

Obrigada a todos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos	1
1.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	4
1.2.1 Biologia e fatores de virulência	4
1.2.2 Manifestações clínicas	6
1.2.3 Tratamento	7
1.3 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	7
1.3.1 Biologia e fatores de virulência	7
1.3.2 Manifestações clínicas	9
1.3.3 Tratamento	9
1.4 Diagnóstico de <i>C.trachomatis</i> e <i>N.gonorrhoeae</i>	10
1.4.1 Isolamento em cultura	10
1.4.2 Testes moleculares	10
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Tipo de estudo	17
3.2 Local de estudo	17
3.3 População do estudo	17
3.4 Critérios de inclusão	17
3.5 Critérios de exclusão	17
3.6 Riscos.....	18
3.7 Benefícios	18
3.8 Entrevista.....	18
3.9 Coleta das amostras	18

3.10 Extração de DNA	19
3.11 Quantificação de DNA.....	19
3.12 Seleção dos iniciadores e sondas	19
3.13 Ensaio de qPCR <i>in house</i>	20
3.14 Interpretação dos resultados.....	21
3.15 Amostras para validação do teste molecular qPCR multiplex <i>in house</i>	22
3.16 Análise estatística	22
3.17 Frequência dos agentes etiológicos <i>C.trachomatis</i> e <i>N.gonorrhoeae</i> na população estudada.....	24
3.18 Aspectos Éticos	24
4 RESULTADOS	25
4.1 Curva padrão	25
4.2 Padronização da reação pela técnica de qPCR multiplex	28
4.3 Sensibilidade e Especificidade	30
4.4 Coletas de amostras e dados	31
4.5 Frequência de <i>C.trachomatis</i> e <i>N.gonorrhoeae</i> em pacientes atendidas em uma unidade de referência na Região Norte do Brasil	31
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO	42
7 REFERÊNCIAS	43
ANEXOS.....	55
ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	55
ANEXO II - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA.....	56
APÊNDICES	57
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	57
APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO ADAPTADO.....	59
APÊNDICE C - MEMBROS DE PESQUISA	60
APÊNDICE D – PRODUTO	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

No ano de 1991, a Organização Mundial de Saúde (OMS), aderiu ao método de abordagem sindrômica para diagnóstico clínico de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em países em desenvolvimento, com intuito de observar os sinais e sintomas e o tratamento imediato destes indivíduos (1). Desde 1993, esta recomendação é utilizada no Brasil, pelo Programa Nacional de Controle de DST (2). Fazem parte dos quadros sindrômicos: corrimentos uretrais, cervicais e vaginais, úlceras genitais, verruga genital e dor pélvica (3). No ano de 2016, o Ministério da Saúde substituiu o termo Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) por Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), devido ao aumento de indivíduos assintomáticos (4).

Conforme a OMS, mais de 1 milhão de infecções sexualmente transmissíveis são diagnosticadas diariamente (5). A cada ano, estima-se que 500 milhões de indivíduos sejam infectados por herpes vírus simples (HSV), 156 milhões por *Trichomonas vaginalis*, 127 milhões por *Chlamydia trachomatis*, 87 milhões por *Neisseria gonorrhoeae*, e 6,3 milhões por *Treponema pallidum* (6). Nas IST, há diversos tipos de agentes etiológicos, porém, as quatro infecções curáveis mais comuns são: *Chlamydia trachomatis* (clamídia), *Neisseria gonorrhoeae* (gonorreia), *Treponema pallidum* (sífilis) e *Trichomonas vaginalis* (tricomoníase) (7).

De acordo com *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos da América (EUA), jovens sexualmente ativos com 15 a 24 anos, correspondem a mais de 20 milhões de casos novos diagnosticados com IST, sendo 53% infectados por gonorreia e 65% por clamídia (8). No entanto, a prevalência de clamídia nesses jovens, é três vezes maior que o acometimento em indivíduos entre 25 a 39 anos (9).

No ano de 2018, foram notificados 583.405 casos de gonorreia nos EUA, o que corresponde em uma taxa de 179 casos por 100.000 habitantes, diferentemente

da clamídia, que obteve um total de 1.758.668 infectados, e um total de 539 casos por 100.000 habitantes (10). O rastreamento de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, na Europa, em 2017-2018, foram de 409.646 e 100.673 casos respectivamente (11).

Pode-se dizer que 70 a 80% das mulheres infectadas pelos agentes etiológicos *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* são assintomáticas, e quando não diagnosticadas e tratadas precocemente, apresentam um impacto negativo para a saúde reprodutiva da mulher (12,13). A promiscuidade sexual e ausência de preservativos são um dos fatores para o surgimento destas infecções, além de se tornarem mais vulneráveis para contrair outras IST, especialmente o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (12–14).

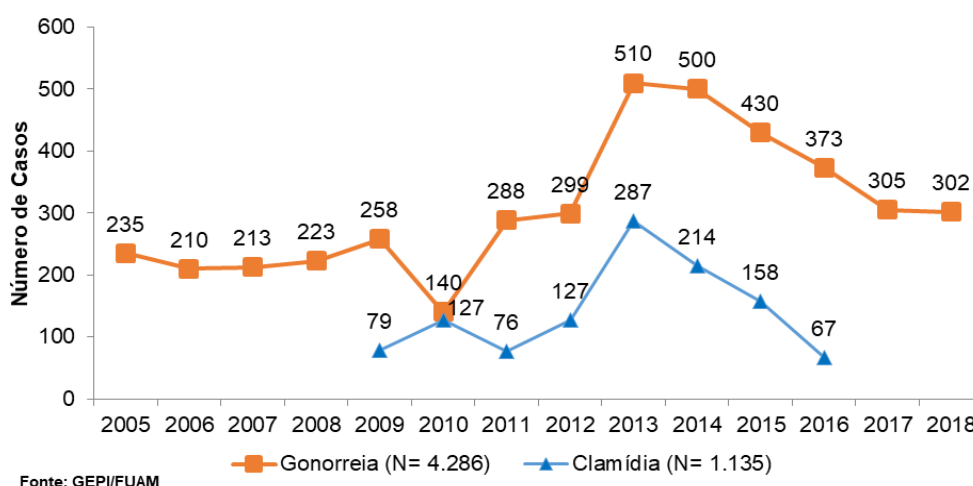
De acordo com estudos epidemiológicos realizados na população brasileira, entre 2000 a 2014, as prevalências encontradas de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, variaram de 11 a 31% (15–17) e 1,4 a 7,1%, respectivamente (13,18). O aumento do número de infecções identificadas e reportadas, foram atribuídos pelo surgimento de novos métodos de rastreio, sendo capazes de detectar os agentes etiológicos em indivíduos que não apresentam sinais e sintomas (8,9). Com isso, embora a maior taxa de prevalência ocorra no sexo feminino, ainda há mulheres em situação de risco que não realizam exames laboratoriais periodicamente para detecção desses agentes (19). No Brasil, não há notificação compulsória de casos com clamídia e gonorreia, no entanto, a prevalência de uma população específica, pode ser encontrada em centros de referência ou em estudos isolados (7).

As IST representam um grande agravo a saúde pública e contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade materna e infantil, além de representarem um estigma associado à culpa e discriminação que podem levar a sérios problemas psicológicos (20). A forma de transmissão das infecções sexualmente transmissíveis ocorre por meio do contato sexual desprotegido, seja ele vaginal, anal ou oral, podendo causar infecções crônicas, como: amigdalite, retite ou ainda a transmissão da mãe para o feto (21). A variação de parceiros sexuais, o sexo sem proteção e a ausência de acesso aos serviços de saúde pública, podem agravar ainda mais a saúde dos infectados (7,20).

Segundo uma pesquisa nacional de saúde, em Manaus, Amazonas, 40,5% dos estudantes do 9º do ensino fundamental têm vida sexual ativa, destes, 85,9% receberam orientação na escola sobre a AIDS e outras infecções, e 72,9% sobre a importância do uso do preservativo (22). Visto isso, é necessário realizar ações que possam contribuir para o aumento de informações, mediante a incentivos de mudanças de comportamentos sexuais, uma vez que a melhor forma de prevenção contra qualquer IST, seja o uso de preservativos (23).

O ambulatório de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), da Fundação Alfredo da Matta (FUAM), atende regularmente pacientes suspeitos de infecção por *N.gonorrhoeae* e/ou *C.trachomatis*. No gráfico 1, é possível observar a evolução do número de casos diagnosticados no período de 2005 a 2018, destacando-se um aumento de notificações no ano de 2013 e um decréscimo nos anos seguintes, entretanto é importante salientar que houve uma menor quantidade de testes realizados neste período, em decorrência da escassez de recursos do serviço.

Gráfico 1 - Notificação de casos de pacientes infectados com clamídia e gonorreia na Fundação Alfredo da Matta, no período de 2005 à 2018



O tratamento para clamídia e gonorreia, é geralmente baseado nos sinais e sintomas clínicos do paciente, no entanto, dado o elevado percentual de casos assintomáticos, é fundamental a implementação de testes diagnósticos com maior sensibilidade, como é o caso dos NAATs (Técnicas de Amplificação de Ácidos

Nucléicos) na rotina dos serviços de saúde e dentre eles a FUAM, que possui uma clínica de IST bem estruturada (24).

1.2 *Chlamydia trachomatis*

1.2.1 Biologia e fatores de virulência

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, incapaz de sintetizar adenosina tri-fosfato (ATP) e o ciclo de desenvolvimento da bactéria descrito na figura 1, possui duas formas distintas: Corpúsculo Reticular (CR) e o Corpúsculo Elementar (CE) (25,26).

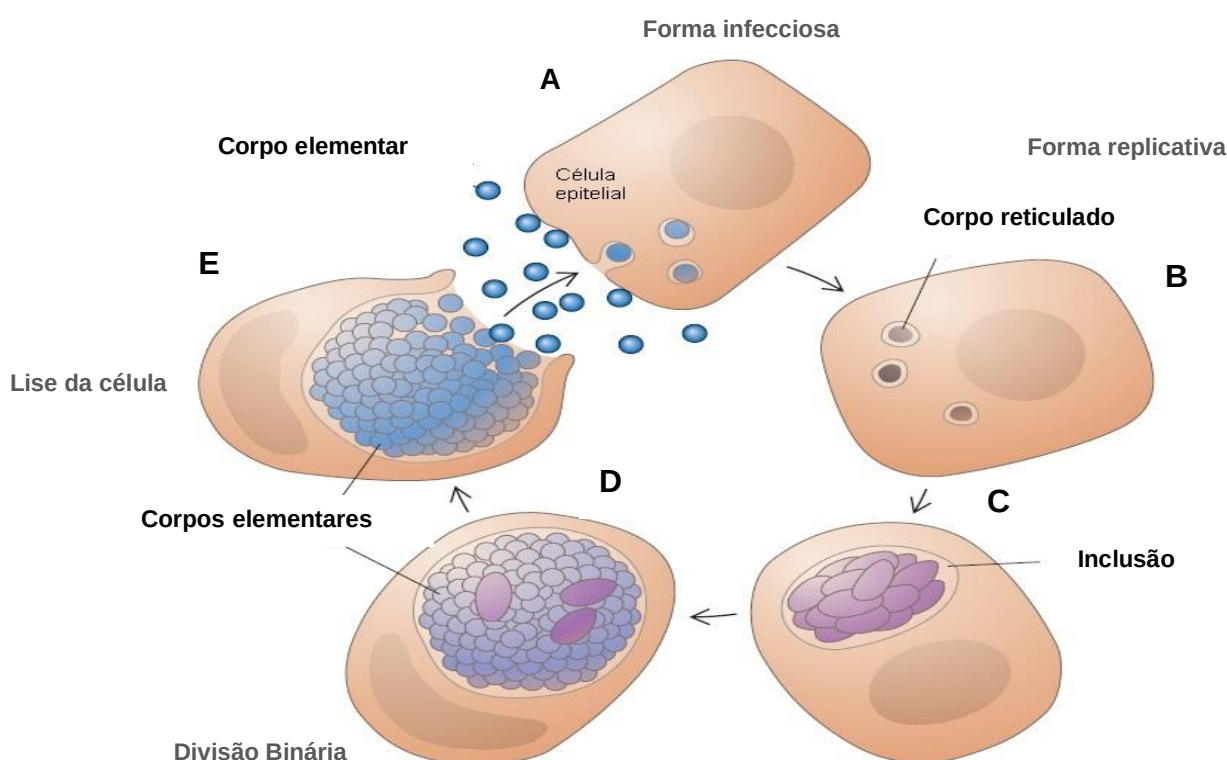


Figura 1 - Ciclo de vida *Chlamydia trachomatis*. Inicialmente, quando o CE entra na célula epitelial fagocítica do hospedeiro, apresenta-se na forma infecciosa, metabolicamente inativa, formando vacúolos citoplasmáticos (Figura 1A), após aproximadamente oito horas da entrada da célula, diferenciam-se em CR, tornando-se metabolicamente ativo, replicativo e não infeccioso (Figura 1B). Os CR (Figura 1C), se reproduzem por divisão binária junto aos vacúolos ligados à membrana e são organizados novamente em CE (Figura 1D). Devido à intensa multiplicação intracelular, ocorrerá o rompimento da célula e do vacúolo, liberando numerosos CE

para infecção de novas células (Figura 1E), reiniciando o ciclo biológico da clamídia (27).

Fonte: Adaptado Walter E. Stamm (28).

As diversas espécies de clamídia, podem ser sorologicamente diferenciadas por meio da proteína principal da membrana externa, conhecida como *Major outer membrane protein* (MOMP) (29). Na parte interna, contém três proteínas, que estão associadas à virulência e envolvidas na adesão à célula hospedeira, que são: *small cysteine-rich outer membrane protein* (OmcA), *outer membrane complex protein B* (OmcB) e *polymorphic membrane proteins* (Pmps) (30). As cepas da espécie *C.trachomatis*, podem ser identificadas por anticorpos monoclonais em até 18 sorotipos distinguíveis de doenças associadas à ela e a infecção por tracoma está relacionado com: A, B, Ba e C; a óculo-genital (não tracomosa) corresponde ao B, C, D, E, F, G e K; e nas infecções causadas por linfogranuloma venéreo (LGV) os sorotipos são L1, L2, L3 (31).

Os plasmídeos, são pequenos segmentos de ácidos desoxirribonucleico (DNA) extra cromossômico circular, que possui a capacidade de se replicar independentemente, dessa maneira uma bactéria pode conter um ou mais plasmídeo críptico (32). Em sua maioria, os plasmídeos são responsáveis por fornecer capacidades adaptativas aos organismos e podem ter diferentes funções como: resistência medicamentosa (plasmídeo de resistência), produção da síntese de colicinas (inibidores da bactéria (plasmídeo col)), produção de enzimas degenerativas (plasmídeo de degradação), causadores de infecções (plasmídeo de virulência), além de serem utilizados para fins de diagnósticos (25).

A *C.trachomatis* contém um genoma de 1.042.519 pb (pares de bases) e um plasmídeo críptico com 7.493 pb. No entanto, segundo estudos realizados na Suécia, uma deleção de 377 pb no plasmídeo, estava impedindo a detecção da bactéria pelo teste Abbott RealTime m2000 CT/NG (Abbott Molecular Inc. Des Plaines, Illinois) (24,33–35).

1.2.2 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas são baseadas nos sinais e sintomas, podendo apresentar: corrimento cervical, disúria, odor, prurido, dispareunia, ou sangramento após as relações sexuais (36). A gravidade da infecção varia de acordo com o curso da doença, podendo ser encontrado complicações ainda mais graves em mulheres assintomáticas, como a gravidez ectópica (7,37). Em relação aos episódios sucessivos de infecção, é provável que o risco das pacientes desenvolverem sequelas sejam altas, sendo responsável pelo surgimento de artrite reativa, com sintomas de uretrite, artrite, uveíte, lesões de pele e membranas mucosas, além dos episódios recorrentes (21,38).

No entanto, a complicação mais comum vista em mulheres infectadas com clamídia é a doença inflamatória pélvica (DIP) (37). Nos Estados Unidos, o total do tratamento da DIP e as demais complicações associadas a bactéria *C.trachomatis*, teve um custo de aproximadamente US \$3202, por paciente. No Brasil, a maior parte do serviço público de saúde, não oferece o diagnóstico molecular como rotina, dificultando o diagnóstico precoce e o tratamento adequado (39).

Nas gestantes, a infecção por *C.trachomatis* pode causar problemas como parto precoce, morte neonatal e doença inflamatória pós-parto. A infecção por exposição perinatal surge da transmissão vertical, durante o trabalho de parto através da mãe infectada para o recém-nascido. Porém, na maioria dos casos, este tipo de transmissão apresenta baixo risco, podendo também estar associada com conjuntivite de inclusão, desenvolvida duas semanas após o nascimento do neonato e quando não tratados, pode haver o surgimento de pneumonia (38,40).

Sintomas como: febre, cefaleia e prostração, surgem após a infecção causada por *C. trachomatis* e podem envolver os linfonodos cerca de 2 a 6 semanas após as lesões iniciais (40). As mulheres que praticam o coito anal sem o uso de preservativo, podem desenvolver manifestações por proctite hemorrágica ou proctocolite, dor, prurido anal, constipação intestinal ou diarreia, secreção mucoide sanguinolenta ou mucopurulenta (20).

A persistência da *C.trachomatis* pode favorecer a entrada do Papilomavírus humano (HPV), e consequentemente desenvolver a neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) por meio das heat shock proteins (HSP60), assim como outras alterações celulares em mulheres que já possuem uma infecção por HPV (41,42). As proteínas sintetizadas pela *C.trachomatis*, apresentam ação anti-apoptótica quando ocorrem infecção persistente, provocando danos ao DNA do hospedeiro, alterando a resposta na reparação do DNA, ocasionando a proliferação celular (43).

1.2.3 Tratamento

Segundo o Ministério da Saúde, uma variedade de agentes antimicrobianos é utilizada no tratamento de infecção por clamídia, dentre eles, destaca-se a azitromicina 1g, apontada como o tratamento de primeira escolha, administrada em dose única (7). No entanto, em casos de resistência antimicrobiana, utiliza-se como segunda opção o uso de um dos medicamentos: eritromicina 500mg ou ofloxacina 400mg por 7 dias. Se mesmo após a utilização dos antibióticos, o paciente continuar apresentando sintomas, é necessário investigar a presença de transmissão persistente do contato e o parceiro, e considerar a presença de outros agentes etiológicos como: *Mycoplasma spp.*, *Ureaplasma spp.* ou *Trichomonas vaginalis* (23). Após o diagnóstico, o profissional de saúde deve instruir o paciente a convidar seus parceiros sexuais dos últimos 60 dias, para avaliação, testagem, orientações e tratamento, afim de se obter um controle efetivo da transmissão da doença (44).

1.3 *Neisseria gonorrhoeae*

1.3.1 Biologia e fatores de virulência

A *Neisseria gonorrhoeae* é uma bactéria gram negativa intracelular, anaeróbia, encapsulada e não formadora de esporos. Apresenta uma forma levemente côncava adjacente e possui envelope celular contendo uma membrana externa com lipossacarídeos, parede celular de peptioglicanos, e membrana citoplasmática interna (20). Os principais fatores de virulência, estão presentes nas

estruturas extracelulares multifuncionais, como o pili ou fimbrias, responsável pela adesão gonocócica ao epitélio do hospedeiro (45).

O genoma da bactéria *N.gonorrhoeae* que corresponde a cepa NCCP11945, consiste em um único cromossomo circular contendo 2.232.025 pb e um plasmídeo críptico de 4.153 pb, com codificação estimada de 87% em todo o genoma e com conteúdo de G+C de 52,4%, semelhantes a sequência da cepa conhecida FA1090, o que corresponde a 54 genes de ácido ribonucleico transportador (tRNAs) e quatro cópias dos operons de ácido ribonucleico ribossômico (rRNAs) (46).

O lipoligossacarídeo (LOS) desencadeia o mecanismo de patogenicidade e uma intensa resposta inflamatória, com liberação do fator de necrose tumoral (TNF). Este mediador é responsável pelo recrutamento de células epiteliais, contribuindo na inflamação e liberação de outras citocinas, como a interleucina-8, até o aparecimento dos sinais e sintomas. Diversas estruturas que estão presente nas células bacterianas também fazem parte da adesão da membrana externa de *N.gonorrhoeae*, como as proteínas *Por b* (porinas) e *Opa* (45,47).

As porinas A (*porA*) e B (*porB*) estão presentes na membrana externa da espécie *N. meningitidis*, no entanto foram identificados em diferentes cepas, isolados clínicos de *N. gonorrhoeae* a presença do pseudogene *porA* eventualmente usado para análises filogenética (48,49). Diversas sequências de genes foram avaliadas para identificação por PCR da *N.gonorrhoeae* como o: *cppB* (plasmídeo críptico), *opA*, *orf1*, 16S rRNA e DNA da citosina de metiltransferase (50,51). No entanto, os resultados dos genes estudados apontaram reação cruzada com espécies comensais de *Neisseria*. Unemo *et al.* (2005), verificou que o pseudogene *porA* apresentou baixo nível de polimorfismo em isolados clínicos e cepas de referência, além de não ser identificado em outras espécies de *Neisseria*, o que pode confirmar que o *porA* é um excelente alvo genético para detecção de *N.gonorrhoeae*, realizados pelos NAATs (48).

1.3.2 Manifestações clínicas

O período de incubação ocorre em média de dez dias após a relação sem proteção e o quadro clínico da doença pode apresentar cervicite, uretrite, corrimento vaginal com a presença ou não de exsudato cervical purulento, disúria e sangramento intermenstrual (52). Embora, a sintomatologia em 90% dos homens seja de disúria e exsudato purulento, nas mulheres a porcentagem da ausência dos sintomas sugestivos de *N.gonorrhoeae* varia entre 50 a 80% (53). A dor pélvica ou abdominal pode está associada a salpingite aguda, causadora mais comum de infertilidade em mulheres infectadas por *N. gonorrhoeae*, acometendo 10% das pacientes(54).

A principal complicação encontrada na mulher infectada e não adequadamente tratada por *N.gonorrhoeae* é a infertilidade. A falta de cuidados adequados favorecem a evolução para casos mais graves, como, anorretite, ofaltmia neonatal e faringite gonocócica, adquirida por meio orogenital (14). Entre 0,5 a 3% das pacientes do sexo feminino infectadas podem vir a desencadear a infecção gonocócica disseminada (IGD), que acomete principalmente pele e articulações, podendo causar artrite infecciosa em adultos jovens (54).

1.3.3 Tratamento

Segundo o Ministério da Saúde, a droga de escolha para o tratamento para *N.gonorrhoeae*, é Ceftriaxona 500mg intramuscular associada à Azitromicina 1g dose única. Desde 2017, houve a suspensão do uso do fármaco Ciprofloxacino como droga de primeira escolha em pacientes infectados com gonorreia, devido à altas taxas de resistência medicamentosa (55), sendo superiores a 50% em todas as regiões do Brasil (56). É importante ressaltar, de acordo com o protocolo do Ministério da Saúde, que o tratamento de clamídia e gonorreia deve ser realizado simultaneamente, independentemente dos sinais e sintomas (7).

1.4 Diagnóstico de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*

Os métodos disponíveis pelo Sistema único de Saúde (SUS), para o rastreamento das infecções *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* é o teste molecular por captura híbrida (CHII CT-ID) e o isolamento em cultura (8,20). No entanto, a reação em cadeia da polimerase (PCR), é uma técnica fundamental para o diagnóstico de doenças infecciosas, possibilitando um maior número de patógenos de maneira mais rápida e precisa.

1.4.1 Isolamento em cultura

O teste laboratorial para identificação da *N.gonorrhoeae*, padrão-ouro no Brasil, é o isolamento em cultura, porém este teste apresenta uma sensibilidade reduzida quando comparado ao ensaio molecular de PCR em tempo real (qPCR) (20). O diagnóstico de *N.gonorrhoeae* por isolamento em cultura apesar de menos sensível (sensibilidade de 70 a 80%), é altamente específico (especificidade de 100%) e muito útil para o monitoramento da resistência antimicrobiana (57).

O isolamento em cultura, já foi um diagnóstico padrão-ouro para identificação da *C.trachomatis*, sendo a técnica que apresentava maior especificidade, chegando a 100% (58). No entanto, de acordo com CDC, não é mais recomendado nos laboratórios dos EUA, devido a sua baixa sensibilidade, complexidade técnica, crescimento lento (48-72h) e alto custo de mão de obra (8). É uma técnica que consiste na inoculação de amostras em monocamadas de células McCoy, cultivadas em anticorpos monoclonais fluorescentes, e quando positivos, apresenta um crescimento da inclusão citoplasmática do CR e CE (26,40).

1.4.2 Testes moleculares

1.4.2.1 Captura Híbrida

O teste de captura híbrida (CHII CT-ID), é um método de hibridização celular que consiste em sondas de RNA específicos da *C.trachomatis*, formando um híbrido

DNA:RNA. É uma reação que possui uma unidade relativa de luz (*Relative Light Unit* – *RLUs*), emitida através da quebra do substrato quimioluminescente, capaz de se ligar em híbridos capturados, resultando em uma amplificação de sinal significativo. Quando a luz é emitida indica presença de DNA da *C.trachomatis*, onde $RLUs \geq 2,5$ RLU/CO indica teste positivo e $RLUs > 1$ e $< 2,5$ RLU/CO negativo (59).

Segundo um estudo realizado por Santos *et al.* (2018), 25,9% dos resultados advindos de mulheres assintomáticas, foram relatados como falsos negativos, pelo teste de captura híbrida, quando comparados ao PCR em tempo real *in house* (qPCR). O teste CHII CT-ID, apresentou sensibilidade moderada de 72,3% e especificidade de 91,3%, diferentemente do qPCR *in house* que apontou uma sensibilidade de 99,5% e especificidade de 95,1%. O uso da técnica de qPCR apresentou um custo por amostra de \$1.33, e \$0.55 pelo ensaio de captura híbrida. No entanto, mesmo após o teste CHII CT-ID, apresentar uma melhor redução de custo, a sensibilidade deste ensaio dificulta o rastreamento do agente etiológico *C.trachomatis* em pacientes que não apresentaram sinais e sintomas, prejudicando o início do tratamento (24). Dessa forma, é necessário que haja uma padronização de novos métodos moleculares que garantem resultados mais eficientes e que tenham melhor redução de custo e tempo (37).

1.4.2.2 Testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs)

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos, são considerados um dos melhores métodos de diagnósticos para a detecção e diferenciação da *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, segundo CDC (8). Desde os anos 90, a utilização deste tipo de ensaio, tem se tornado comum em laboratórios de biologia molecular (60). Os NAAT são baseados nas técnicas de PCR convencional e/ou tempo real, Reação em Cadeia da Ligase (LCR) e Amplificação por Deslocamento de Cadeia (DAS); apresentando uma rápida detecção do DNA genômico das bactérias, além de demonstrar uma alta sensibilidade e especificidade, o que possibilita a identificação do microrganismo de interesse, assim como, na quantificação de alterações voltadas ao tratamento (61).

A técnica qPCR consiste na amplificação de sequências de ácidos nucleicos específicos, utilizando iniciadores (*primers*) que se ligam a uma determinada região de DNA, e sondas marcadas com fluorescência, que aumentam a especificidade da reação mesmo em pequenas quantidades de amostras. Também, é possível amplificar mais de um segmento genômico (alvo) distinto, em uma única reação, de um mesmo agente etiológico ou de agentes etiológicos diferentes, visando economias de reagentes e diagnóstico preciso (62). Os kits comerciais mostram um bom desempenho, uma alta sensibilidade e especificidade, no entanto, apresentam custo elevado. Em vista disso, é fundamental o desenvolvimento de métodos moleculares adaptados à rotina ambulatorial e laboratorial, a fim de obter o melhor custo benefício (24).

Um estudo realizado, na Fundação Alfredo da Matta, em Manaus, Amazonas, com 239 mulheres de 13 a 59 anos, atendidas no setor de IST, verificou que a frequência encontrada em pacientes acometidas com *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* foi de 23,1% e 15,4% respectivamente. Houve uma forte associação entre infertilidade e mulheres co-infectadas por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* (54,1%; $p<0,0001$), reforçando a necessidade de estratégias efetivas para diagnóstico precoce de infecções sexualmente transmissíveis, principalmente em mulheres assintomáticas em idade fértil (13).

Diversos estudos, avaliaram a sensibilidade e especificidade dos diferentes métodos de diagnósticos utilizados para a detecção de clamídia e gonorreia, conforme mostrado na Tabela 1:

Tabela 1 - Diferentes métodos moleculares de diagnósticos para detecção de IST e suas respectivas características

Nº	Autores	Local	Nº amostral	Doença	Métodos moleculares	S (%)	E (%)
1	Muvunyi <i>et al.</i> , 2011 (63)	Ruanda, África Ocidental	80 mulheres inférteis	Gonorreia	PCR (STDFinder)	100%	100%
2	Levi <i>et al.</i> , 2012 (64)	Estados Unidos da América	1054 mulheres	Clamídia	1- BD ProbeTec 2- Captura Híbrida	1- 100% 2- 66,7%	1- 99,9% 2- 99,9%
3	Krölov <i>et al.</i> , 2014(65)	Tartu, Estônia	70 mulheres 19 homens	Clamídia	RT- RPA	83%	100%
4	Gaydos, 2008(66)	Estados Unidos da América	276 indivíduos	1 - Clamídia 2- Gonorreia	qPCR (GeneXpert)	1- 97,4% 2- 100%	1- 99,6% 2- 100%
5	Perera <i>et al.</i> , 2017(67)	Winnipeg, MB, Canadá	254 indivíduos	Gonorreia	qPCR Multiplex	100%	ND*
6	Pickering <i>et al.</i> , 2018(68)	Tanzânia e Guiné-Bissau	210 mulheres	Clamídia	1- qPCR Kit comercial (Amplicor CT/NG) 2- ddPCR	1 - 97,6% 2- 97,18%	1- 90% 2- 96,55%
7	Van <i>et al.</i> , 2018(69)	Holanda	183 mulheres	Clamídia	1- ELISA IgG de IgG anti-CT 2- Immunoblot CT da Mikrogen	1- 65% 2- 54%	1- 52% 2- 71%
8	Nye <i>et al.</i> , 2018(70)	Multicêntrico	5266 mulheres 738 homens	1 - Clamídia 2- Gonorreia	Teste Cobas CT / NG v2.0	1- 91,2% a 97,6% 2- 95,6% a 100,0%	1- 99,2% a 99,7%, 2- 99,3% a 100,0%

S (%): Sensibilidade, **E (%)**: Especificidade, **ND***: Nada consta

O qPCR multiplex tem se destacado como uma importante técnica para a identificação de diferentes microorganismos, sendo considerado um método de diagnóstico molecular altamente sensível, que permite a detecção de dois ou mais alvos em uma única reação, ou seja são utilizadas sondas marcadas com um fluoróforo, que servirão para identificar e quantificar cada alvo separadamente (71).

Um estudo avaliou a presença de sete microorganismos sexualmente transmissíveis, nas 897 amostras coletadas de paciente, testados por diferentes métodos moleculares. Dentre eles, estão presentes os agentes etiológicos

C.trachomatis e *N.gonorrhoeae*. Para a detecção desses dois agentes, foram utilizados os ensaios moleculares de qPCR multiplex (Anyplex II), PCR multiplex (Seeplex) e a amplificação de deslocamento de cadeia (SDA) (BD ProbeTec ET). Para análise de discrepância, foi definido os testes confirmatórios (padrão-ouro): NAATs (*C.trachomatis*) e cultura (*N.gonorrhoeae*) e os resultados foram avaliados quanto a sensibilidade e especificidade encontrada em cada teste. Na detecção da *C.trachomatis*, representadas pelos testes qPCR multiplex (Anyplex II), PCR multiplex (Seeplex) e o teste SDA indicou uma sensibilidade de 100%, 96,68% e 83,9% e especificidade de 100%, 99,4% e 99,4%, respectivamente. E para *N.gonorrhoeae*, a sensibilidade dos testes foram de 100% e 88,9% e especificidade de 99,2%, 99,7% e 99,9%. Diante disso, é possível perceber que o teste de qPCR multiplex, apresenta melhor reprodutibilidade e confiabilidade quando comparado ao teste SDA (72).

Rumyantseva *et al.* (2015), demonstra que o ensaio molecular qPCR multiplex, apresenta alta sensibilidade clínica e analítica e excelente especificidade para detecção de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*. Os testes de referência foram o Aptima GC assay (Hologic) e o Cobas Taqman CT v. 2.0 (Roche Molecular Systems), com o intuito de determinar o desempenho do diagnóstico molecular qPCR multiplex na busca de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, com sensibilidade de 97,5% e 100% e especificidade 100%. Com isso, o qPCR multiplex, apresenta performance semelhante aos testes padrão-ouro, possibilitando o uso do ensaio na identificação de ambos (73), assim como outros microorganismos (74–76).

O uso das técnicas moleculares em centros de referência no Brasil, tornou-se uma ferramenta essencial voltada ao diagnóstico das IST, principalmente na detecção das bactérias *N.gonorrhoeae* e *C.trachomatis*, pois além de apresentar uma boa reprodutibilidade na identificação do alvo de interesse, seja em indivíduos sintomáticos ou assintomáticos, também permite a detecção precoce desses agentes, tratamento adequado, prevenção de complicações associadas à essas doenças assim como a diminuição de novos casos (77,78).

Levando em consideração os avanços que a biologia molecular vêm trazendo nos últimos anos, o método de qPCR multiplex é comprovadamente uma técnica

sensível, rápida, e de melhor custo benefício. Tendo em vista que as infecções causadas por clamídia e gonorreia representam um importante agravo em saúde pública, em virtude de sua alta incidência e com apresentação clínica majoritariamente assintomática, é necessário que novos métodos laboratoriais de detecção, sejam capazes de auxiliar o clínico na decisão diagnóstica. Nesse contexto, o presente estudo propõe padronizar e implementar o uso do método qPCR multiplex *in house* para detecção simultânea de *C. trachomatis* e de *N. gonorrhoeae*, em mulheres sintomáticas e assintomáticas, atendidas no setor de IST da Fundação Alfredo da Matta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Padronizar a técnica de qPCR multiplex como método de diagnóstico das bactérias *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, em mulheres sintomáticas e assintomáticas, em uma unidade de referência na Região Norte do Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar o qPCR multiplex para a amplificação parcial de genes das bactérias *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, além do gene humano *ACTB* (β actina), simultaneamente.
- b) Avaliar a acurácia do ensaio de qPCR multiplex *in house*.
- c) Verificar o limite de detecção do número de cópias de DNA de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, através da curva padrão.
- d) Determinar a frequência dos agentes etiológicos *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* por qPCR multiplex *in house* em pacientes do sexo feminino atendidas no setor de IST do centro de referência Fundação Alfredo da Matta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo de teste diagnóstico, realizado por amostragem por conveniência baseado no atendimento da rotina clínica do setor de IST feminino, durante o período de fevereiro a julho de 2019.

3.2 Local de estudo

O estudo foi realizado no centro de referência Fundação Alfredo da Matta (FUAM), localizado em Manaus, Amazonas, Região Norte do Brasil, no setor de IST feminino, seguido das análises moleculares no Laboratório de Biologia Molecular.

3.3 População do estudo

Foram selecionadas mulheres que tiveram atendimento especializado, no setor de IST feminino da FUAM, com queixa de um ou mais sinais e sintomas sugestivos das infecções causadas por clamídia e gonorreia, como: corrimento esbranquiçado, exsudato purulento, disúria, odor, dispareunia e/ou sangramento nas relações sexuais. Para as participantes do estudo cujo parceiro apresentou corrimento uretral, em sua maioria, eram consideradas assintomáticas.

3.4 Critérios de inclusão

Pacientes do sexo feminino atendidas no setor de IST maiores de 18 anos que aceitem participar do estudo.

3.5 Critérios de exclusão

Pacientes do sexo feminino menor de 18 anos, gestantes, indígenas, e aquelas que fizeram uso de antibióticos durante os 15 dias anteriores.

3.6 Riscos

Durante o procedimento de coleta endocervical pode haver um leve desconforto, sem maiores consequências para as pacientes. Todo o procedimento foi realizado por uma profissional experiente do setor de IST da FUAM.

3.7 Benefícios

Acesso ao diagnóstico molecular das bactérias *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, por métodos mais eficazes do que os utilizados na rotina de atendimento da FUAM, permitindo inclusive o diagnóstico de mulheres assintomáticas. O diagnóstico correto e precoce evitará complicações futuras, além de interromper a cadeia de transmissão da doença.

3.8 Entrevista

As pacientes foram convidadas a participarem do estudo de forma voluntária, seguido com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (apêndice a). Após o consentimento da voluntária, realizou-se um questionário adaptado da ficha clínica do setor (apêndice b), com o intuito de adquirir informações comportamentais e socioeconômicas de cada paciente, para análise de fatores de risco, como: idade, parceiro fixo, parceiro eventual nos últimos três meses, uso do preservativo, e os sinais e sintomas.

3.9 Coleta das amostras

Todas as amostras foram coletadas por profissionais especializados do setor de IST feminino, onde foi necessário coletar uma única amostra cervical por participante, auxiliada por um espécúlo esterilizado e uma escova do *kit hc2 DNA Collection Device* com haste adaptada para partição, e transportadas para o tubo *Specimen Transport Medium (QIAGEN)* contendo 1mL de líquido conservante e específico. As amostras cervicais, foram armazenadas inicialmente à uma temperatura ambiente e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da FUAM, mantidas em -20° C até o devido processamento e leitura.

3.10 Extração de DNA

Para a realização da extração de DNA, foi necessário o uso do Kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), através do tubo coletor *Specimen Transport Medium* (QIAGEN), seguido de acordo com o protocolo (apêndice c). Após o procedimento, as alíquotas de DNA foram mantidas em micro tubos (Eppendorf) de 1,5 ml em uma temperatura de -20°C, corretamente identificadas.

3.11 Quantificação de DNA

As concentrações de DNA foram calculadas, utilizando o equipamento espectrofotômetro UV-Vis *Biodrop Duo*, com a configuração de quantificação de DNA, e absorbâncias por 260nm/280nm e 260nm/230nm. As amostras obtidas do DNA foram avaliadas quanto a concentração e pureza do produto, pois o excesso ou pouca quantidade de DNA poderiam dificultar em uma melhor análise.

3.12 Seleção dos iniciadores e sondas

A sequência dos iniciadores e sondas utilizadas para o estudo, foram baseadas nos artigos de Santos *et al.* (2018), e Hjelmvoll *et al.* (2006), seguido dos alvos, plasmídeo críptico (*C.trachomatis*) e *porA* (*N.gonorrhoeae*), respectivamente (Tabela 2). Os iniciadores foram baseados no artigo Girmatsion *et al.* (2011) e sonda do alvo ACTB (β -actina), foram cedidos pelo Dr. Felipe Gomes Naveca (Tabela 3).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos dos iniciadores e sonda dos alvos plasmídeo críptico e *porA*

	Plasmídeo Críptico(A)	<i>porA</i> (B)
Primer Senso	CT_F 5' – CTAGGCGTTTGTACTCCGTC -3'	NG_F 5' – GTTTCAGCGGCAGCATTCA – 3'
Primer anti senso	CT_R 5' – TGTCTTCGTAACGCTCC – 3'	NG_R 5' – CCGGAAGTGGTTTCATCTGATT – 3'
Sonda	5' – VIC – TTGCAGCTTGTAGTCCTGCTTGAGA – 3'	5' – FAM – CGTGAAAGTAGCAGGCGTATAGGCGGACTT - 3'

(A/B): Sequência dos iniciadores de **PC** e **porA** advindo dos artigos (24,79)

Tabela 3 - Oligonucleotídeos dos iniciadores e sonda do alvo ACT (β -actina)

	ACTB (β-actina)(A)
Primer Senso	F 5' –TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG -3'
Primer anti senso	R 5' – GCATTTGCGGTGGACGAT – 3'
Sonda	5' – NED – CGAGTCCGGCCCCCT – 3'

(A): Sequência dos iniciadores e sonda advinda do artigo (80)

3.13 Ensaio de qPCR *in house*

A reação do qPCR *in house*, foi realizada através do equipamento de qPCR StepOnePlus (*Applied Biosystem*), tendo como alvo o gene humano constitutivo *ACTB* (β -actina), como controle de qualidade da extração, um volume final de 10 μ L utilizando: 300 nM dos iniciadores forward e reverse, 100 nM de sonda, 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystem*®), 2,3 H₂O puro e 2 μ L de DNA. As condições termocíclicas foram: 2 min a 50 ° C e 10 min a 95 ° C, seguidas de 40 ciclos de 15s a 95° C e a 60 ° C. Foram testadas diferentes concentrações dos pares de iniciadores do PC e o gene *porA*, com a finalidade de padronizar a reação do teste.

Inicialmente, foram utilizados os alvos isolados (singleplex), a fim de, obter um padrão de amplificação para cada sonda. Em seguida, foram utilizados dois pares de iniciadores e duas sondas simultaneamente (duplex), otimizando os reagentes e o DNA no ensaio. Posteriormente, com a reação já padronizada, os três alvos foram testados, com o intuito de, amplificar as três sequências de DNA concomitantemente, em uma única reação (triplex) (Figura 2). Neste contexto, para definir os limites de detecção de cada alvo foram realizadas duas curvas de diluição seriada partindo de concentrações de DNA conhecidas, com o objetivo de obter dados que comprovem a eficácia da técnica.

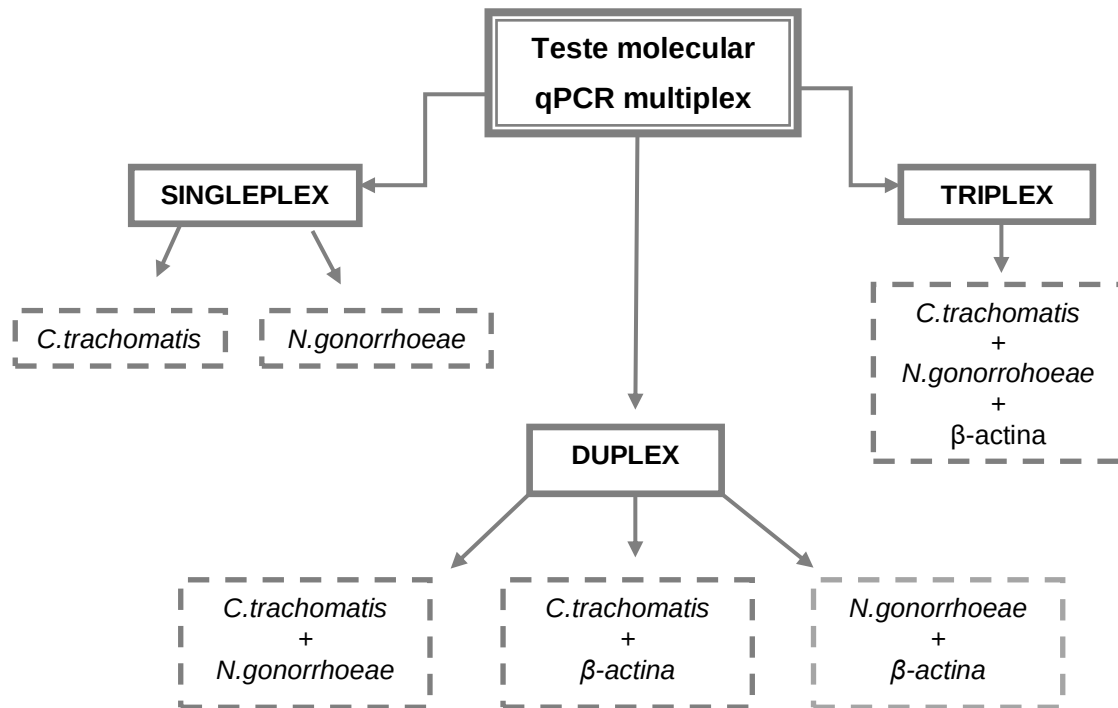


Figura 2 - Fluxograma da metodologia utilizada para otimização do teste molecular qPCR multiplex para amplificação dos alvos PC (*C.trachomatis*) e *porA* (*N.gonorrhoeae*).

3.14 Interpretação dos resultados

Cada ensaio contém um par de primers e uma sonda TaqMan MGB (*Life Technologies*) visualizada de acordo com cada fluorescência. A região amplificada é marcada com a fluorescência repórter na extremidade 5' e um quencher não fluorescente (silenciador) na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, há redução da fluorescência emitida pelo reporter devido à proximidade da molécula quencher. Na presença da sequência alvo específica, ocorre o anelamento da sonda e primers, com a consequente clivagem da sonda pela ação da atividade 5' nuclease da Taq polimerase à medida em que ocorre a extensão da sequência. A separação dessas duas moléculas, quencher e reporter, permite o aumento da emissão de fluorescência que é detectado pelo equipamento a cada ciclo da qPCR. Para cada alvo específico foi utilizado um corante distinto, NED na detecção do ACTB, VIC para PC e FAM para *porA*.

Todas as amostras cervicais das pacientes, foram testadas em duplicatas e interpretadas de acordo com os valores obtidos pelo Ct (*cycle threshold*) e *threshold* de 0,02. O mesmo limite de detecção dos ciclos (*cycle threshold*) foi estabelecido para interpretar a curva padrão, contendo uma diluição seriada de fragmentos em genes (gBlocks) do alvo plasmídeo críptico da *C.trachomatis* e um DNA isolado (*American Type Culture Collection* (ATCC)) da bactéria *N.gonorrhoeae*. Para verificar a concentração inicial de DNA encontrada no alvo do estudo, os resultados de Ct das amostras testes foram interpolados com a curva padrão. Quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade do número de cópias de DNA na amostra.

3.15 Amostras para validação do teste molecular qPCR multiplex *in house*

Para validação do teste de qPCR multiplex, foram utilizadas 93 amostras biológicas provenientes do projeto de pesquisa intitulado: “Frequência relativa dos agentes etiológicos de corrimento uretral em homens atendidos em serviço de referência em Manaus-AM”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FUAM (Nº parecer 1662858), coordenado pela pesquisadora Lucilene Sales de Souza. Os resultados dessas amostras, obtidos pelo kit comercial realizado no laboratório Sabin, em Manaus-AM, foram definidos como padrão-ouro a fim de validar a técnica de qPCR multiplex *in house*. Nenhum dado primário ou secundário dessas amostras foram utilizados, apenas o resultado do teste de qPCR do kit LightCycler multiplex DNA master (*Roche Life Science*). Todas as amostras foram então codificadas e testadas aleatoriamente para os cálculos de: sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e concordância através do índice Kappa.

3.16 Análise estatística

Os dados de informações comportamentais e socioeconômicas das participantes do estudo, foram tabulados através do programa de software Microsoft Excel. Posteriormente, utilizou-se o programa STATA/SE versão 11.2 (Stata), baseados nas características de desempenho do teste de qPCR multiplex *in house*, nos cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), concordância através do índice Kappa, acurácia e curva padrão. Esses cálculos, são avaliados para verificar a exatidão do teste proposto.

Dessa forma, avaliar a sensibilidade do teste, é fundamental para identificar aqueles indivíduos que portam a doença. É um teste que apresenta uma baixa probabilidade de ocorrer resultados falsos-negativos, diferentemente da especificidade, que possui a capacidade de identificar indivíduos que não estão infectados, evitando resultados falsos-positivos.

O valor preditivo positivo (VPP) é capaz de verificar a probabilidade do indivíduo infectado ser realmente positivo. Já o valor preditivo negativo (VPN), analisa a probabilidade do indivíduo com resultado negativo ser realmente saudável. Esses cálculos servem como auxílio para os profissionais da saúde, trazendo confiabilidade no teste para casos de difíceis diagnóstico.

A concordância através do índice Kappa, é utilizada para medir o grau da concordância observada e esperada dos dois métodos utilizados. Quando um valor de Kappa, é abaixo de zero (0,00 – 0,20), indica que o resultado do teste não foi concordante com o que se esperava, causando uma discordância entre eles, diferentemente de uma concordância boa que apresenta valores entre 0,61 – 0,80 e uma excelente de 0,81 – 1,00.

Para avaliar a acurácia do teste, é necessário calcular o VPP e VPN divididos pelo total de indivíduos do teste (tabela 2x2), é um parâmetro cujo intuito é verificar o grau de exatidão dos resultados apresentados, determinado pela razão de probabilidade negativa (RP), sendo: <1 (acurácia ótima), 0.1-0.2 (acurácia moderada), 0.2-0.5 (acurácia pequena), 0.5-1.0 (acurácia nula).

A curva padrão é utilizada para determinar quantitativamente uma propriedade obtida de uma amostra desconhecida a partir de amostra com concentrações conhecidas, onde é possível analisar os valores dos Cts adquiridos ao decorrer da amplificação da curva. A inclinação da curva padrão indica a eficiência do qPCR, avaliada de acordo com o valor do coeficiente de determinação (R^2) estiver entre 0,99 e 1; *Slope* à -4.0 a -3.32, *Y-Intercept* e eficiência. Visto isso, é necessário que o procedimento seja realizado com precisão, a fim de obter uma curva de qualidade.

3.17 Frequência dos agentes etiológicos *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* na população estudada

Após a realização do ensaio molecular já padronizado, os resultados obtidos foram avaliados, a fim de verificar a frequência do número de casos diagnosticados com *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* na população estudada. Todos os resultados, foram encaminhados ao setor de IST feminino da FUAM, mesmo após todas as pacientes, terem sido tratadas previamente, seguindo de acordo com a recomendação do Ministério da Saúde. Por se tratar de uma clínica de referência de IST, todas as pacientes realizam testes disponíveis para detecção de diferentes patógenos. Foram analisados dados secundários da ficha clínica de cada uma das mulheres atendidas, os demais tipos de IST presentes durante o período do estudo, como: lesões sugestivas de HPV (Condiloma acuminado e lesões de colo do útero), *Treponema pallidum* (sífilis) e HIV.

3.18 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Alfredo da Matta (FUAM), em Manaus, Amazonas, no dia 07 de fevereiro de 2019, seguido do número de parecer 3.525.149 e CAE 03144918.4.0000.0002 (Anexo I).

4 RESULTADOS

4.1 Curva padrão

Realizou-se uma curva padrão utilizando duas amostras de referência que corresponde em um fragmento de genes em blocos (*Gblock*) do PC com 150 pb, com uma média de concentração de DNA de 11,2 ng/μL, para *C.trachomatis*, com um total de 1.428.174 cópias alvo de DNA por reação e um ATCC (*American Type Culture Collection*) referente a cepa 19424, com 2.269.984 cópias de DNA de *N.gonorrhoeae* na concentração de 12,5 ng/μL.

Esta curva, foi otimizada no equipamento de qPCR StepOnePlus (Applied Biosystem), com sete pontos de detecção (10^{-1} a 10^{-7}), em diluições seriadas de 1:10, estabelecendo um limite de 14,2 (10^{-6}) cópias genômicas de *C.trachomatis*, equivalente a uma concentração de 0,022 picograma (pg) de DNA, para um Ct de 35,7. Para *N.gonorrhoeae*, foi estabelecido um limite de 22,6 (10^{-7}) cópias genômicas, equivalendo a uma concentração de 0,0025 pg de DNA, e um Ct de 36,6 validando assim, a amplificação (Tabela 4).

Tabela 4 - Sete pontos de diluições da curva padrão de *C.trachomatis* (*Gblock*) e *N.gonorrhoeae* (ATCC19424), e os respectivos valores de Ct obtidos por qPCR multiplex *in house*

Curva padrão de DNA de CT e NG			
Pontos de detecção (<i>C.trachomatis</i>)	Média de Ct	Pontos de detecção (<i>N.gonorrhoeae</i>)	Média de Ct
10^{-1}	17,9	10^{-1}	14,3
10^{-2}	22,2	10^{-2}	17,9
10^{-3}	25,4	10^{-3}	22,1
10^{-4}	29,1	10^{-4}	25,6
10^{-5}	31,3	10^{-5}	29,3
10^{-6}	35,7	10^{-6}	32,8
10^{-7}	-	10^{-7}	36,6

A Figura 3 mostra a amplificação do alvo de *C.trachomatis* obtidas pela amostra de referência (*Gblock*), partindo de concentrações de 11,2 ng/ μ L, seguida de diluições seriadas de 1:10. Este ensaio foi avaliado quanto à seus respectivos Cts nos sete pontos de detecção.

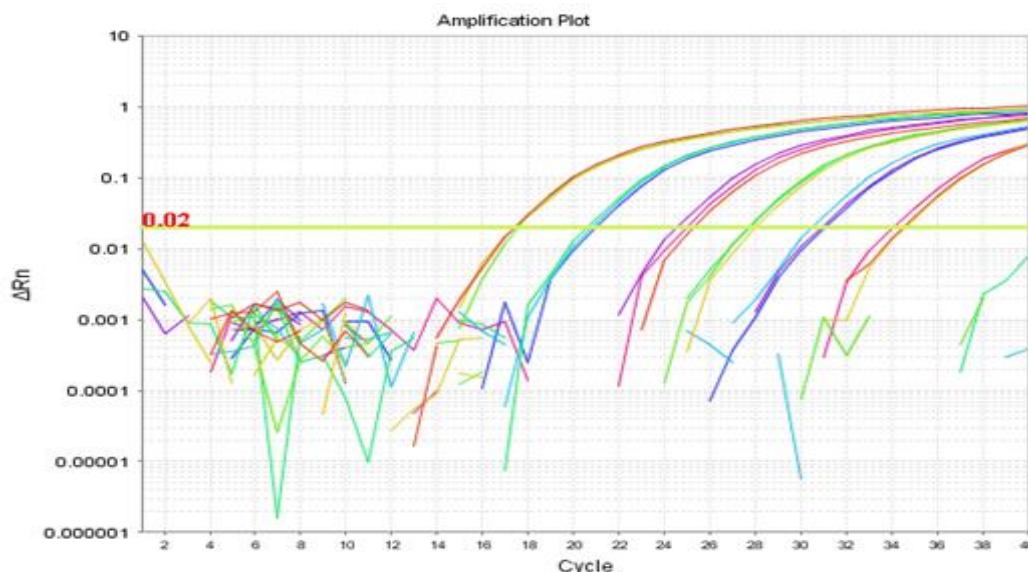


Figura 3 - Amplificação da curva padrão de DNA do agente etiológico *C.trachomatis*, obtidos pelo ensaio de qPCR *in house*

Os valores de absorbância na detecção de *C.trachomatis*, apresentou uma eficiência de 100%, com o valor de coeficiente de determinação da regressão (R^2) de 0,99 (aceitável: 0,990 a 1,000), e declive (Slope) de -3,31, o que corresponde a Figura 4.

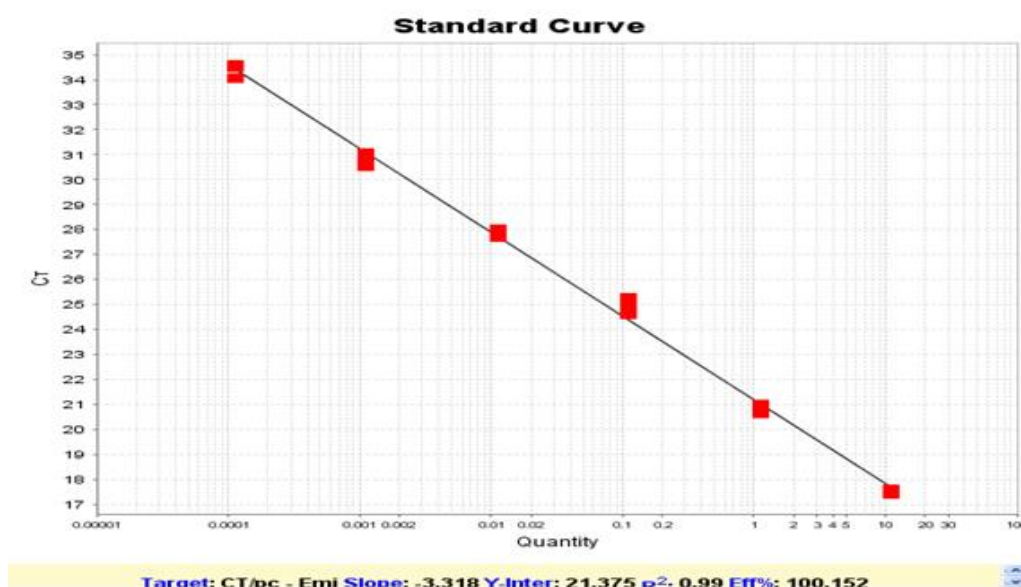


Figura 4 – Curva padrão de *C.trachomatis* com os pontos e limites de detecção da quantidade de DNA, e seus respectivos Cts

A Figura 5 mostra a amplificação do alvo de *C.trachomatis* obtidas pela amostra de referência (ATCC19424), partindo de concentrações de 12,5 ng/ μ L, seguida de diluições seriadas de 1:10. Este ensaio foi avaliado quanto à seus respectivos Cts nos sete pontos de detecção.

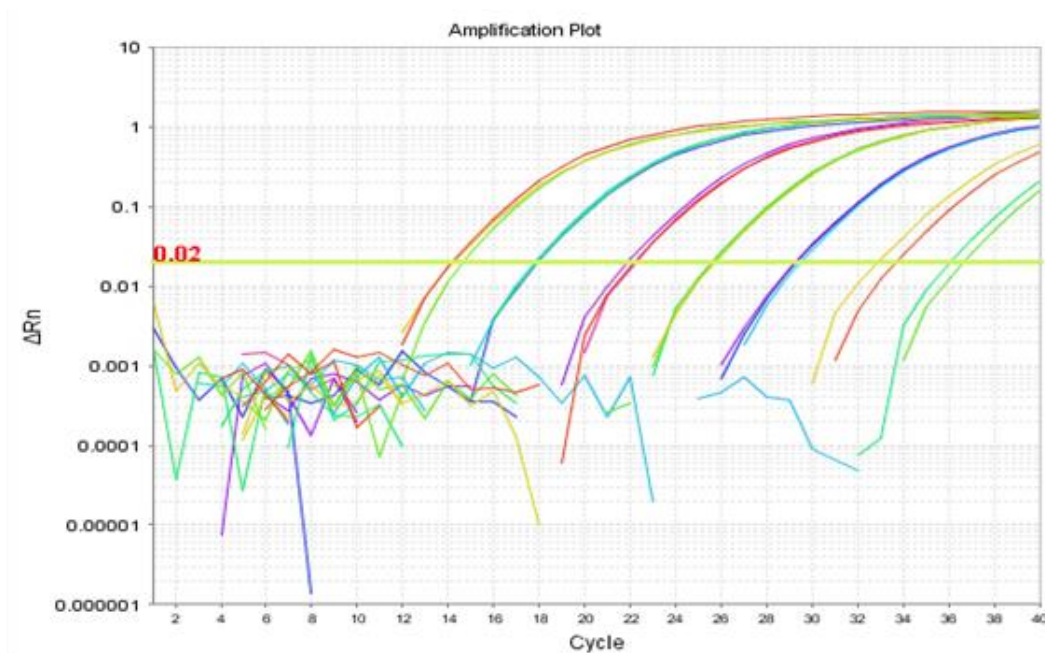


Figura 5 - Amplificação da curva padrão do agente etiológico *N.gonorrhoeae*, obtidos pelo ensaio de qPCR *in house*.

Os valores de absorbância na detecção de *N.gonorrhoeae*, apresentou uma eficiência de 85%, valor de R^2 de 0,99, e *slope* de -3,72 para *N.gonorrhoeae*, seguido da Figura 6. E assim, dessa forma, foi possível validar um procedimento que servirá como controle de qualidade em um futuro teste, no Laboratório de Biologia Molecular da FUAM.

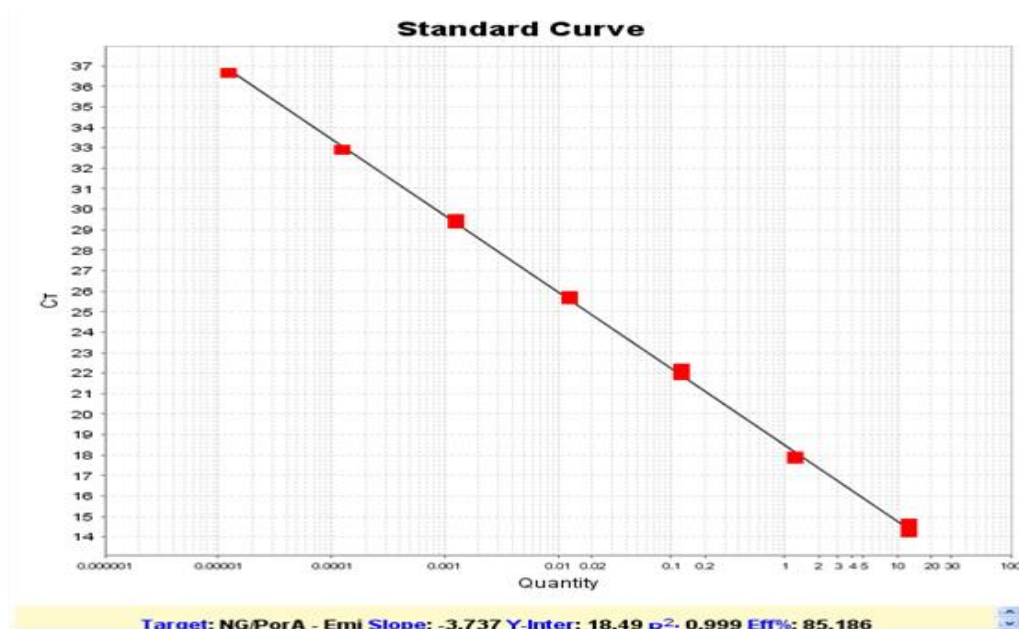


Figura 6 – Curva padrão de *N.gonorrhoeae* com os pontos e limites de detecção da quantidade de DNA, e seus respectivos Cts

4.2 Padronização da reação pela técnica de qPCR multiplex

Para método duplex, foram testadas quatro diferentes concentrações dos primers senso e anti-senso (0.1 μ M, 0.2 μ M, 0.3 μ M e 0.5 μ M), utilizando amostras sabidamente positivas para clamídia e gonorreia, de acordo com a Tabela 5:

Tabela 5 - Concentrações finais dos pares de iniciadores dos alvos Plasmídeo Críptico e *porA*, para a padronização da reação em duplex

Plasmídeo Críptico (<i>C.trachomatis</i>) []* Forward/Reverse	Ct (cycle threshold)	<i>porA</i> (<i>N.gonorrhoeae</i>) [] Forward/Reverse	Ct (cycle threshold)
300 nM (0,3 μ M)	19,06	500 nM (0,5 μ M)	26,04
300 nM (0,3 μ M)	18,81	300 nM (0,3 μ M)	25,91
300 nM (0,3 μ M)	18,82	200 nM (0,2 μ M)	26,34
300 nM (0,3 μ M)	18,80	100 nM (0,1 μ M)	26,71
500 nM (0,5 μ M)	18,87	300 nM (0,3 μ M)	26,12
200 nM (0,2 μ M)	18,92	300 nM (0,3 μ M)	26,28
100 nM (0,1 μ M)	19,38	300 nM (0,3 μ M)	26,72

*Concentração

O critério de escolha na seleção do par de iniciadores utilizado para o teste, foi baseado nos alvos que atingiram um Ct (*cycle threshold*) menor. Por essa razão, a melhor concentração encontrada para a detecção dos dois agentes etiológicos, foi de 300 nM (0,3 µM). Para otimizar o volume final da reação, utilizou-se 20 µL, padronizando a reação para início das análises, obtendo: 300 nM de cada iniciador para cada alvo, 200 nM de sonda (*Invitrogen*), 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystem®*), 3,2 de H₂O puro e 4 µL de DNA.

Após a padronização da reação, foi necessário otimizar o teste para identificação de dois agentes etiológicos (*C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*) e um alvo molecular para controle de qualidade (β -actina), a fim de verificar se a extração de DNA foi realizada satisfatoriamente. Posteriormente, deu-se início ao duplex, onde todos os alvos, foram testados aleatoriamente, e amplificados simultaneamente. No triplex, utilizou-se um pool de amostra positivas para *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, utilizando 3 concentrações (0.2 µM, 0.3 µM e 0.5 µM) do par de oligonucleotídeos de iniciadores de β -actina (Tabela 6), e um volume final de 20 µL, com o propósito de amplificar os três alvos em uma única reação.

Tabela 6 - Concentrações dos pares de iniciadores do gene ACTB (β -actina) para a padronização da reação, em triplex

Plasmídeo Críptico [] Forw/Rev	Ct	<i>porA</i> [] Forw/Rev	Ct	β -actina (ACTB) [] Forw/Rev	Ct
300 nM (0,3 µM)	*	300 nM (0,3 µM)	23,06	500 nM (0,5 µM)	23,88
300 nM (0,3 µM)	*	300 nM (0,3 µM)	21,99	300 nM (0,3 µM)	24,04
300 nM (0,3 µM)	*	300 nM (0,3 µM)	21,76	200 nM (0,2 µM)	23,76

*Não amplificado

No entanto, não houve amplificação na detecção do Plasmídeo críptico (*C.trachomatis*), inviabilizando a utilização do método triplex pela técnica proposta no estudo. É importante destacar que a vantagem de utilizar um gene constitutivo humano (β -actina) como alvo, é avaliar a qualidade da amostra coletada, uma vez que mesmo em amostras negativas, a amplificação deste gene deve estar presente.

Com isso, é possível afirmar que a técnica de qPCR multiplex *in house*, foi padronizada em duplex, havendo a necessidade de testar o alvo ACTB isoladamente. O procedimento da análise amostral foi realizado semanalmente, de acordo com a demanda do setor.

4.3 Sensibilidade e Especificidade

Foram utilizadas 93 amostras uretrais, separadas e codificadas por um profissional do Laboratório de Biologia Molecular, de forma que o pesquisador responsável pela realização da técnica de qPCR multiplex *in house*, não identificasse previamente os resultados dos pacientes. Isso foi importante para evitar viés durante a interpretação do teste, sendo o resultado da análise das amostras, o padrão-ouro. Baseado nos resultados obtidos do laboratório Sabin, 40 (43%) pacientes apresentaram resultado positivo para *N.gonorrhoeae*, 9 (9,6%) para *C.trachomatis*, 17 (18,2%) tiveram co-infecção, e 27 (29%) apresentaram resultado negativo para os dois agentes etiológicos. Todas as amostras foram testadas pelo método duplex, de acordo com a padronização da reação.

Para determinar a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, acurácia e o índice Kappa, foram realizados cálculos separadamente para os dois alvos do estudo, contendo indivíduos que apresentaram co-infecção. Os resultados obtidos pela técnica de qPCR multiplex *in house*, apontou uma sensibilidade de 92,5% (IC 95%: 71,9 - 96,1) e especificidade de 100% (IC 95%: 94,5 - 100) para *C.tra*

chomatis, em contrapartida, para a detecção da bactéria *N.gonorrhoeae*, a sensibilidade foi de 100% (IC 95%: 93,7 – 100) e especificidade de 94,4% (IC 95%: 81,9 – 98,5), seguido da Tabela 7.

Tabela 7 - Cálculos avaliados para verificar a exatidão da técnica de qPCR multiplex

Parâmetros	Valor (%)		IC 95%	
	CT	NG	CT	NG
Sensibilidade	92,5 %	100 %	71,9 - 96,1%	93,7 – 100%
Especificidade	100 %	94,4 %	94,5 – 100 %	81,9 – 98,5%
Valor preditivo positivo (VPP)	100 %	96,6 %	86,2 – 100%	88,5 – 99,1%
Valor preditivo negativo (VPN)	95,7 %	100 %	88 – 98,5%	89,8 – 100%
Acurácia	96,8%	97,8%	90,9 – 98,9%	92,5 – 99,4%
Índice Kappa	0,92	0,95	0,83 - 1,01 %	0,89 – 1,02%

4.4 Coletas de amostras e dados

Um total de 179 mulheres foram recrutadas no setor, de acordo com o período estabelecido. Das 179 amostras coletadas, uma foi excluída da análise, por não haver apresentado amplificação para o gene constitutivo humano β -actina, obtendo um total de 178 amostras analisadas. Todas as pacientes que aceitaram participar do estudo, assinaram o TCLE, foram entrevistadas e os seguintes dados foram anexados na plataforma Excel.

4.5 Frequência de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* em pacientes atendidas em uma unidade de referência na Região Norte do Brasil

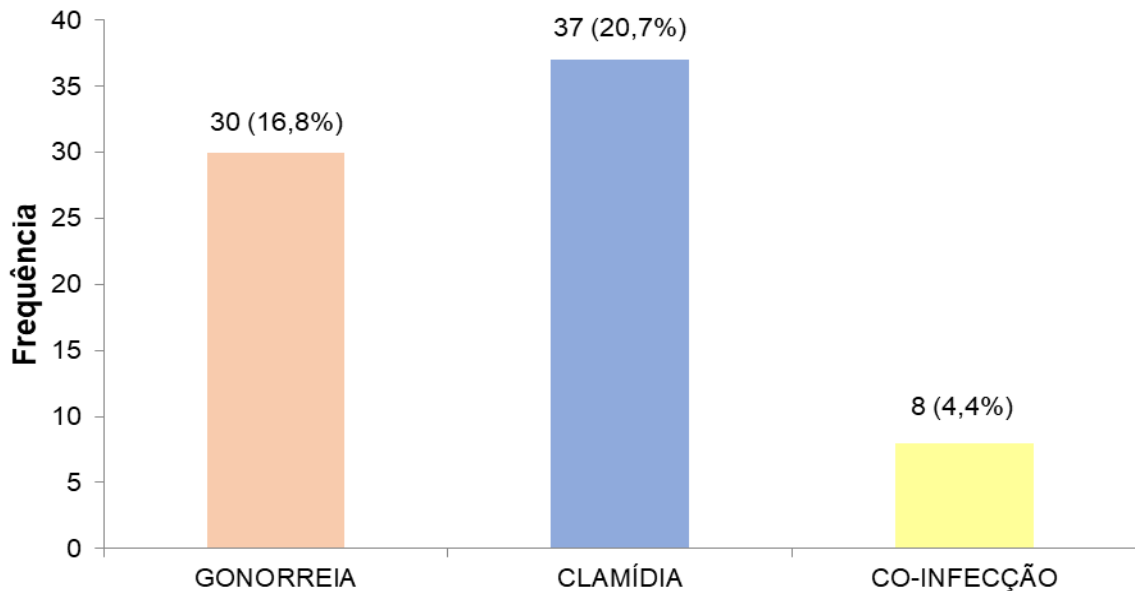
Durante a entrevista, foram avaliadas as principais variáveis epidemiológicas das 178 mulheres, com idade mediana de 29 anos, atendidas na FUAM. Na distribuição por faixa etária, o grupo de maior frequência foi 18 a 24 anos (42,1%) (Tabela 8). Das 178 participantes, 47,2% (84/178) não fazem o uso frequente de preservativo, e apenas 16,8% (30/178) relatam utilizar durante o ato sexual. Entretanto, 79,7% (142/178), não conheciam os principais problemas ocasionados pelas IST e/ou nunca fizeram quaisquer tipos de exames.

Tabela 8 - Características comportamentais das 178 recrutas em um centro de referência no Amazonas, Brasil, 2019

Variáveis	N	%
IDADE		
18 – 24	75	42,1
25 – 31	33	18,5
32 – 38	34	19,1
39 – 45	29	16,2
46 – 52	6	3,3
53 MAIS	1	0,8
PARCEIRO FIXO		
SIM	126	70,8
NÃO	52	29,2
PARCEIRO EVENTUAL NOS ULTIMOS 3 MESES		
NÃO	108	60,7
UM	59	33,1
MAIS DE UM	11	6,2
USO DO PRESERVATIVO		
USA	30	16,8
NÃO USA	64	36
AS VEZES	84	47,2

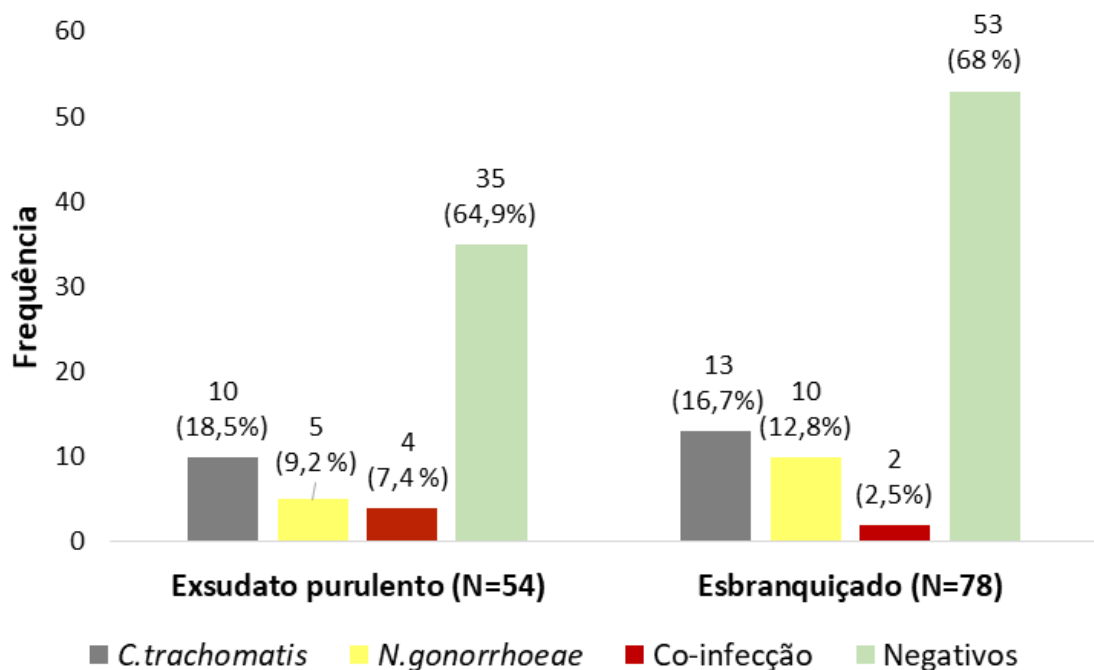
Baseado no diagnóstico molecular dos dois agentes etiológicos deste estudo, destaca-se a bactéria *C.trachomatis*, como a maior causadora de infecção na população estudada, correspondendo a um total de 37 (20,7%) mulheres infectadas, seguido de acordo com o gráfico 2.

Gráfico 2 - Frequência das doenças clamídia e gonorreia em mulheres atendidas na Fundação Alfredo da Matta, em Manaus, Amazonas



Em relação a presença de corrimento cervical e vaginal, 132 participantes apresentaram corrimento, sendo 54 (41%) exsudato purulento e 78 (59%) esbranquiçado. Destas, 23 (17,4%) foram positivas para *C.trachomatis*, 15 (11,4%) para *N.gonorrhoeae*, 6 (4,5%) apresentaram co-infecção e 88 (66,7%) apontaram resultados negativos (Gráfico 3).

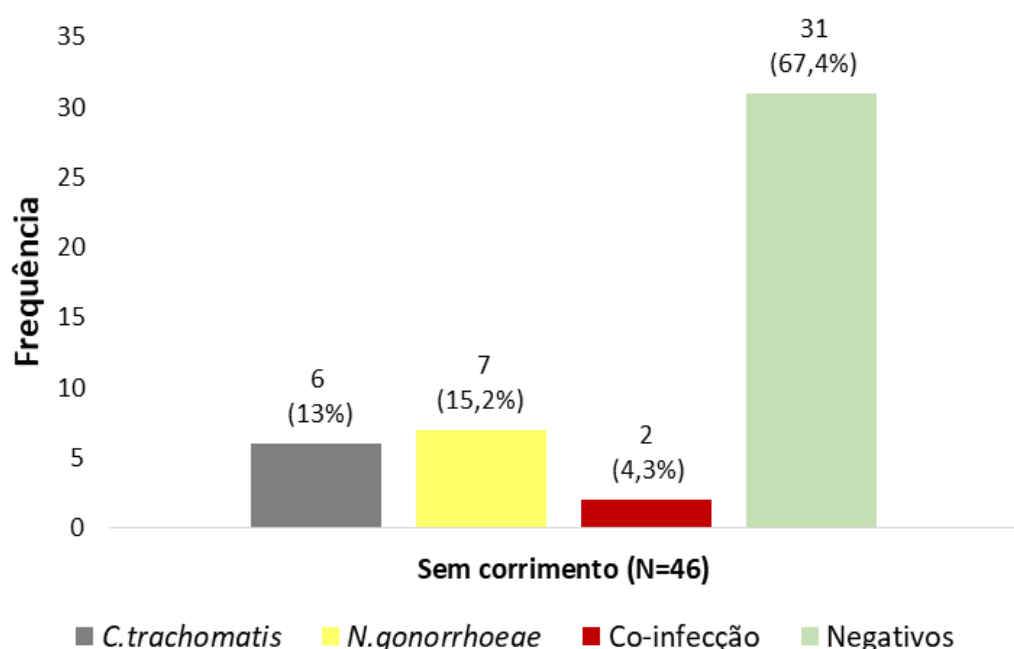
Gráfico 3 - Representação dos tipos de corrimento associado aos resultados do teste de qPCR multiplex *in house*



Não houve a detecção de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* pelo teste de qPCR multiplex *in house* em 88 pacientes (resultados negativos) que apresentaram corrimento, entretanto, é importante salientar que a presença de corrimento em mulheres nem sempre sugere infecção por clamídia ou gonorreia, sendo necessário a investigação de outros agentes etiológicos com sinais e sintomas semelhantes, como: *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium* e candida sp. A utilização de métodos caseiros, também podem ser um fator de inibição na detecção dos patógenos no ensaio, além de auxiliar no tratamento adequado, pois o excesso de medicamentos, podem vir a desencadear uma resistência aos fármacos.

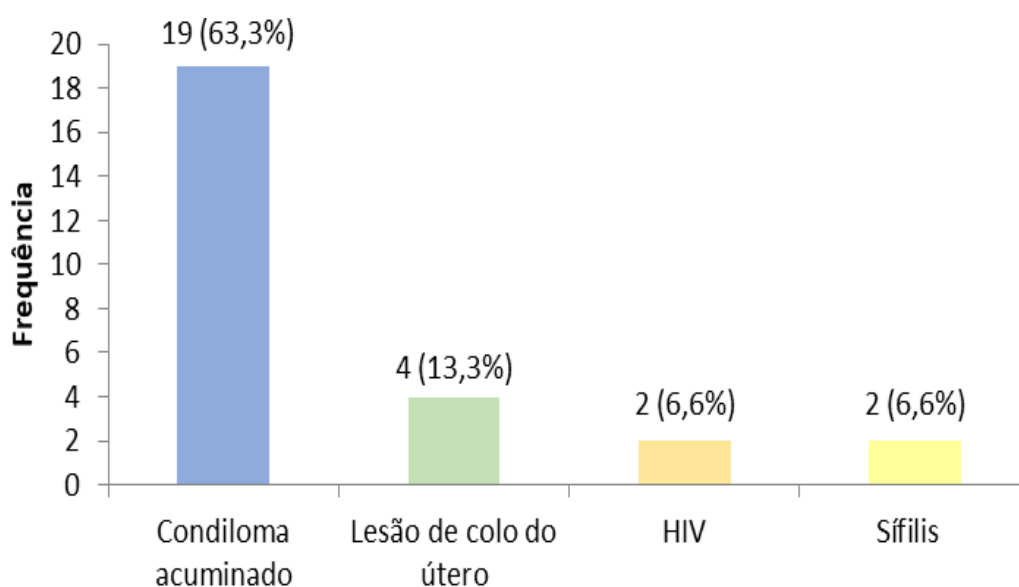
Do total das 178 amostras analisadas, 46 (25,8%) mulheres não apresentaram quaisquer tipos de corrimento, no entanto 6 (13%) foram positivas para *C.trachomatis*, 7 (15,2%) para *N.gonorrhoeae*, 2 (4,3%) tiveram co-infecção, o que equivale a quase 35% dessa população. Visto isso, o ensaio molecular é uma ferramenta fundamental para a rotina clínica de IST, sendo possível a detecção em indivíduos assintomáticos, capaz de auxiliar nos atendimentos especializados que se baseiam somente na abordagem sindrômica (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Diagnóstico de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* por qPCR multiplex *in house* baseado na ausência de corrimento das participantes do estudo



Das participantes que foram infectadas com *C.trachomatis* e/ou *N.gonorrhoeae*, 40% (30/75) tinham associação com outras IST. Destas, evidenciaram-se aquelas que apresentavam lesões sugestivas de HPV (condiloma acuminado e lesão de colo de útero), como a IST mais frequente e que também possuíam um dos agentes etiológicos (Gráfico 5). Das pacientes que não foram infectadas por *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, 43,6% (52/119) possuíam infecção por outros patógenos.

Gráfico 5 - Número de casos infectados com *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* associadas à outras IST



Dentre todas as mulheres do estudo, 23 (12,9%) não apresentaram qualquer tipo de sinais e sintomas (corrimento esbranquiçado, exsudato purulento, odor, disúria, dispareunia ou sangramento nas relações sexuais), entretanto, foram detectadas 4 (17,4%) com *C.trachomatis*, 3 (13%) com *N.gonorrhoeae* e 1 (4,3%) possuía os dois agentes etiológicos, comprovando que a presença de clamídia e gonorreia, é encontrada em mulheres assintomáticas. Dentre as mulheres do estudo

De acordo com os resultados obtidos das 178 participantes, 119 mulheres (66,8%) e 59 (33,1%), apresentaram resultados negativos e positivos para ambos os patógenos, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

O CDC e a Força Tarefa de Serviços Preventivos dos EUA (USPSTF) recomendam que a triagem de clamídia e gonorreia, sejam realizadas anualmente em mulheres sexualmente ativas menores de 25 anos de idade. Tendo em vista, que nesta idade ocorre o maior número de casos, é primordial que se faça a investigação dessas IST independentemente do grupo de idade, principalmente naquelas em situação de risco, como: presença de múltiplos parceiros, uso inconsistente de preservativos, uso de drogas e profissionais do sexo (81,82).

No Brasil, não há dados que comprovem a incidência das bactérias *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, e a falta do rastreamento pode prejudicar o controle e a detecção desses patógenos. Atualmente, a Fundação Alfredo da Matta não conta com qualquer teste de rotina para a detecção de *C.trachomatis*, por sua vez, está disponível o isolamento por cultura como método de identificação da *N.gonorrhoeae*, no entanto, não é um teste que apresente uma alta sensibilidade, o que dificulta no diagnóstico clínico-laboratorial (23,83).

Embora os ensaios moleculares não sejam mais econômicos que os convencionais, o custo do tratamento em casos de complicações associadas à essas infecções são maiores quando comparados a terapêutica precoce. É importante salientar que o uso dos testes moleculares é fundamental no cotidiano dos laboratórios. O CDC preconiza este tipo de ensaio para uso de diagnóstico de clamídia e gonorreia (84), sendo substancialmente mais sensíveis que as técnicas anteriores, pois além de evitar consequências adversas, como sequelas ocasionadas pela DIP e a gravidez ectópica, poderá auxiliar no rompimento da cadeia de transmissão.

O presente estudo, teve o propósito de avaliar o desempenho da técnica de qPCR multiplex *in house*, como método de diagnóstico diferencial das bactérias *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, através dos alvos Plasmídeo Críptico e *porA*, nas 178 recrutas atendidas em uma clínica de IST, em Manaus, Amazonas.

Para o desenvolvimento do ensaio multiplex, precisou-se limitar as concentrações da sonda e dos pares de iniciadores, para que não houvesse competição durante a amplificação dos diferentes alvos, pois concentrações muito altas ou baixas poderiam comprometer a sensibilidade nas reações. Desta forma, utilizou-se uma concentração menor de pares de iniciadores de 0,3 μM e de 0,2 μM de sonda, com um volume final de 20 μL e utilizando 4 μL de DNA extraído. Essa padronização, teve o intuito de evitar gastos excessivos de reagentes, e consequentemente visando à otimização da reação sem reduzir a sensibilidade do teste. De acordo com os trabalhos científicos (85–89), as concentrações dos pares de iniciadores encontrados variam de 0,4 μM - 0,6 μM , utilizando 0,2 μM de sonda e um volume final de 25 μL – 50 μL com 5 μL de DNA, diferentemente da padronização de reação obtida no presente trabalho.

A busca pelo serviço de saúde voltadas ao diagnóstico e tratamento de IST, ainda é um desafio para a saúde pública no país. A *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, são as IST que mais acometem jovens entre 15 a 24 anos, visto isso, a melhor forma de prevenção, para evitar o aumento de transmissão dessas doenças, ainda é o uso contínuo do preservativo. Entretanto, apenas 22,5% da população brasileira sexualmente ativa, na região Norte, utilizou este método de prevenção nos últimos 12 meses com parceria casual ou fixa, ou seja, causando um aumento de transmissão de uma possível infecção (90). A faixa etária de mulheres diagnósticas com os patógenos em um centro de referência de IST, na FUAM, foi entre 18 a 35 anos, o que concilia com a faixa de idade encontrada em pacientes acometidos em diferentes estudos (91–95).

A prevalência das pacientes infectadas com clamídia e gonorreia, obtidas neste estudo, foi de 16,8% e 20,7% respectivamente. Destas, 18,6% (14/75) não apresentaram sinais e sintomas sugestivo das infecções, porém, foram positivas para *C.trachomatis* e HPV. Um estudo publicado recentemente, relata que a presença da bactéria *C.trachomatis* favorece a persistência do vírus do HPV no colo do útero, assim como outras IST (96). A prevalência de co-infecção de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* associadas a outras IST foi de 25,3% - 68%%, isso pode ser explicado devido uma vida sexual promíscua, carência de informação, ausência de

métodos diagnósticos acessíveis e ausência de sintomas ou sintomatologia inespecíficas (97,98).

Para a padronização do ensaio molecular, foram utilizadas amostras com resultados positivos e negativos para *N.gonorrhoeae* e *C.trachomatis*, por meio do kit comercial *LightCycler multiplex DNA master (Roche Life Science)*. Sabe-se que o uso de kits comerciais apresenta alta sensibilidade e especificidade para identificação destes agentes etiológicos (85,99). Entretanto, é importante ressaltar que o custo por reação de um kit comercial de qPCR é elevado quando comparado ao de qPCR *in house*, uma vez que em ambos os testes, os resultados são satisfatórios (37,100). Dessa forma, este ensaio serviu como parâmetro e um bom indiciador para avaliação do desempenho da técnica de qPCR multiplex *in house*.

O ensaio multiplex, possibilitou a detecção das 40 amostras positivas de *N.gonorrhoeae* através do alvo *porA*, apontando uma sensibilidade e especificidade de 100% e 94,4%, respectivamente. Ambos os resultados corroboraram com estudos realizados na Austrália e Noruega, que mostraram sensibilidade e especificidade de 100%, utilizando o mesmo alvo (79,85). O uso do pseudogene *porA*, para amplificação de DNA da bactéria *N.gonorrhoeae*, é frequentemente utilizado em trabalhos científicos (101,102), entretanto outros alvos podem ser utilizados para detecção deste agente etiológico.

Outro alvo de escolha também utilizado para fins de diagnóstico, é o gene *opA*, contudo o pseudogene *porA* destaca-se por apresentar alta sensibilidade no ensaio molecular voltado para detecção de *N.gonorrhoeae* (51,103). Um estudo realizado no ano de 2018, em Manaus, AM, avaliou que o uso do alvo *porA* apresentou uma sensibilidade de 100%, diferentemente do gene *opA* que teve 83% de sensibilidade (103). Por essa razão, a opção de escolha do alvo foi baseada na sensibilidade encontrada no teste molecular de qPCR obtidos por esses diferentes estudos.

A especificidade do teste diagnóstico qPCR multiplex *in house* analisadas através do painel de amostras sabidamente positivas e negativas de *C. trachomatis*, foram de 100%, porém apresentou uma sensibilidade de 92,5%. O teste molecular de qPCR *in house*, utilizando o mesmo alvo, apontou uma sensibilidade de 99,5%,

de acordo com o estudo realizado por Santos *et al.* (2018) (24). No entanto, apesar da técnica de qPCR ser altamente sensível, é possível que as amostras utilizadas para a validação do teste tenham sofrido degradação do DNA, comprometendo a detecção da bactéria *C.trachomatis*. Tal resultado também pode ser explicado, por ser uma reação realizada em duplex, pois fluorescências diferentes podem competir entre si e ofuscar a detecção da outra, ou seja, a utilização do sonda do plasmídeo críptico marcada com o fluoróforo VIC tenha reduzido a sensibilidade do teste, quando associada a sonda do pseudogene *porA* marcada com o fluoróforo FAM, já que esta perda ocorreu após utilizar os dois pares de iniciadores e as sondas simultaneamente, o que concorda o artigo de Kuchta *et al.* (2007) (104). Provavelmente, por esse mesmo motivo, não tenha sido possível a padronização da reação por tríplex.

Contudo, baseado nos parâmetros avaliados do teste molecular proposto neste estudo, a *N.gonorrhoeae* e a *C.trachomatis* demonstraram uma boa sensibilidade e especificidade, quando comparados à cultura em meio específico (Sensibilidade: 80 %; Especificidade 82 – 97%), e o de CHII CT-ID (Sensibilidade: 72,3%; Especificidade: 91,3%), o que pode resultar em um aumento significativo de falsos negativos, pois a baixa sensibilidade inviabiliza a detecção em indivíduos assintomáticos (37).

No presente estudo, o VPP do qPCR multiplex *in house* apresentou-se superior a 90% para ambos os patógenos, e o grau de concordância para os ensaios apresentaram resultados excelentes, tanto para clamídia (Kappa: 0,92) quanto para gonorreia (Kappa: 0,95), como já demonstrado em outros estudos (24,105). De acordo com a OMS, é recomendado uso de NAAT para detecção de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* em ensaio multiplex quando o teste apresentar um VPP superior a 90% e quando aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) (23). Um dos primeiros testes moleculares desenvolvidos nos ensaios de hibridização de ácidos nucleicos não amplificados, foram os *Non-amplified Nucleic Acid Hybridization Assays* (NAH), porém não são propostos para fins de diagnóstico quando os NAAT estiverem disponíveis, justamente por serem considerados testes menos sensíveis. Existem diferentes fabricantes licenciados que produzem NAAT para detecção de

tipos de espécimes distintos, portanto, é fundamental conduzir este tipo de ensaio a uma validação de teste *in house*, o que propõe o estudo.

Diferentes estudos, tem demonstrado que o uso de NAAT possui um melhor desempenho do que os testes disponíveis no mercado (106–108). Os ensaios de qPCR multiplex oferecem diversas vantagens para a detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, incluindo custos reduzidos quando há a padronização de volumes e concentrações da reação e tempo de processamento (107). No entanto, ainda existem algumas preocupações no uso de formatos multiplex, como o uso do conjuntos de iniciadores e sondas em uma única reação, podendo ocasionar a formação de estruturas secundárias entre os oligonucleotídeos (71). Vale ressaltar que essas estruturas podem resultar em sensibilidade reduzida em comparação aos ensaios utilizados individualmente, além de apresentar resultados falso-negativos.

O valor estimativo por pessoa no rastreamento da *C.trachomatis* no diagnóstico molecular de qPCR *in house*, no Laboratório de Biologia Molecular, na FUAM em Manaus, Amazonas, foi de \$0,86. O tempo de observação, unidades de estudo e alocação do tempo dos técnicos de laboratórios que realizam tarefas periodicamente, teve um valor estimado de \$5,11, seguido de acordo com o piso salarial do servidores públicos no ano de 2015 (24). Nossos dados, entretanto, demonstram um ensaio eficiente de baixo custo e operacionalmente viável no âmbito do hospital de dermatologia tropical.

Dessa forma, pode-se afirmar que o diagnóstico realizado através da técnica de qPCR multiplex *in house*, é capaz de apresentar uma eficácia similar à um kit comercial, mesmo após a análise de sensibilidade de *C.trachomatis*, assim como auxiliar na busca das doenças em mulheres assintomáticas na rotina clínico-laboratorial em centros de referência.

Uma árvore de classificação a partir da utilização de técnicas de qPCR *in house* é proposta para o manejo de amostras de pacientes suspeitas por infecção de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, como demonstrado na Figura 7.

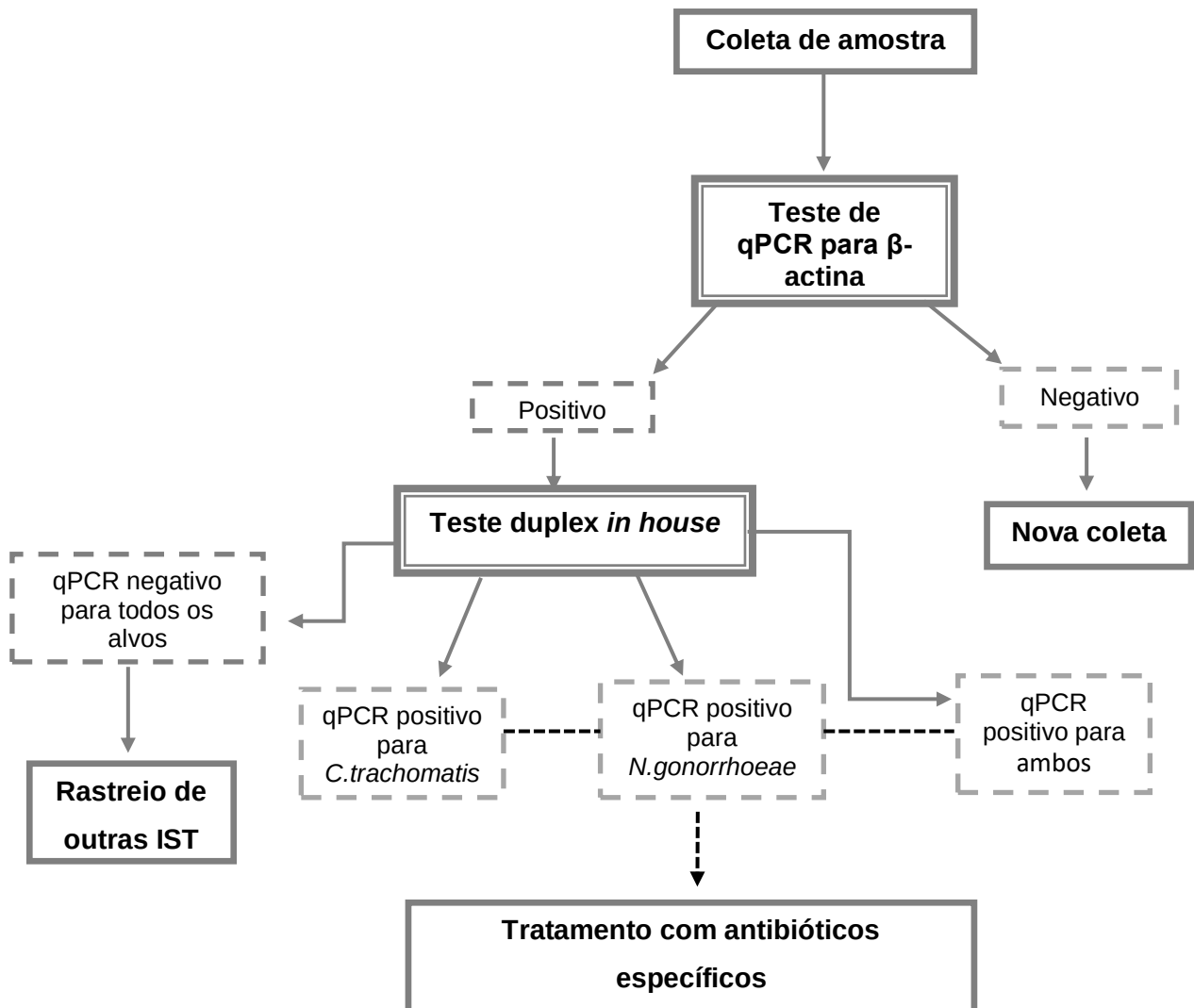


Figura 7 - Árvore de classificação para diagnóstico molecular de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*

6 CONCLUSÃO

a) A reação de qPCR multiplex *in house* foi padronizada em duplex, a fim de detectar os alvos do plasmídeo críptico de *C.trachomatis* e *porA* de *N.gonorrhoeae* simultaneamente. Não foi possível a detecção dos alvos PC, *porA* e β -actina em uma única reação, inviabilizando a reação em triplex, sendo necessário a realização de detecção do gene ACTB, isoladamente ou utilizar um outro alvo constitutivo humano.

b) O desempenho do ensaio molecular apresentou alta sensibilidade e especificidade para um diagnóstico rápido e preciso no rastreamento do agente etiológico *N.gonorrhoeae*. Mesmo após a *C.trachomatis* apresentar sensibilidade de 92,5%, também é considerado um método molecular com potencial para o uso na rotina clínica diagnóstica.

c) A curva padrão dos agentes etiológicos *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, foi realizada através de concentrações conhecidas, obtidas em sete pontos de detecção, estabelecendo uma concentração de 0,022pg e 0,0025pg e um limite 14,2 e 22,6 de número de cópias genômicas respectivamente.

d) A frequência das infecções clamídia (20,7%) e gonorreia (16,8%) encontradas em mulheres atendidas na FUAM, foi um indicador importante, uma vez que nenhuma das pacientes que aceitaram participar do estudo estavam em busca de testes para detecção dos patógenos. Além disso, uma frequência de 40% de mulheres que tinham lesões sugestivas de HPV também possuíam *C.trachomatis* e/ou *N.gonorrhoeae*, o que reflete na importância de se ter estes testes na rotina da FUAM.

Por fim, esta pesquisa gerou um produto direcionado à FUAM e a todos os envolvidos na busca de novos métodos moleculares na detecção de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* (Apêndice D), com o objetivo de mostrar a importância da utilização do teste qPCR multiplex *in house*, na Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas.

7 REFERÊNCIAS

1. Redwood-Campbell L, Plumb J. The syndromic approach to treatment off sexually trasmitted diseases in low-income countries. J Obstet Gynaecol Canada [Internet]. 2002;24(5):417–24. Available from: [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)30405-4](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(16)30405-4)
2. Moherdau F, Vuylsteke B, Siqueira LFG, Santos MQ, Jardim ML, Brito AM, et al. Validation of national algorithms for the diagnosis of sexually transmitted diseases in Brazil: results from a multicentre study [Internet]. Sexually Transmitted Diseases; 1998. p. 38–43. Available from: <http://dspace.itg.be/bitstream/handle/10390/5219/1998stin0S38.pdf?sequence=1>
3. Nadal SR, Carvalho JJM. Syndromic approach to Sexually Transmitted Diseases [Internet]. Revista Brasileira de Coloproctologia; 2004. p. 70–2. Available from: https://www.sbcpr.org.br/revista/nbr241/P70_72.htm
4. Ministério da Saúde. Nota informativa nº 8.901/2016 (Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis). 2016. p. 03 a 17.
5. World Health Organization (WHO). Management of sexually transmitted diseases [Internet]. Genebra, Suíça: World Health Organization (WHO); 2005. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/sti/pub6/en/>
6. Newman L, Rowley J, Hoorn S Vander, Wijesooriya NS. Global Estimates of the Prevalence and Incidence of Four Curable Sexually Transmitted Infections. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015;(10):1–17. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143304>
7. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST A e HV. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para atenção integral as pessoas com infecções sexualmente transmissíveis [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. Available from: bvsms.saude.gov.br/.../protocolo_clinico_diretrizes_terapeutica_atencao_integral_pessoal_pess
8. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. MMWR Recomm Rep [Internet]. 2014;63:1–19. Available from:

- <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6302a1.htm>
9. Centers for Disease Control and Prevention. CDC Grand Rounds: Chlamydia Prevention: Challenges and Strategies for Reducing Disease Burden and Sequelae. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60(12):370–3.
 10. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2018 [Internet]. 2018. Available from: <https://www.cdc.gov/std/stats18/default.htm>
 11. European Centre for Disease Prevention and Control. An agency of the European Union. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe [Internet]. 2018. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/annual-epidemiological-reports>
 12. Fernandes MA, Bezerra MM, de Moura FM de JSP, Alencar NES, Lima FFF, Castro AED. Infecções sexualmente transmissíveis e as vivências de mulheres em situação de reclusão. *Rev Enferm*. 2016;24(6):1–6.
 13. Benzaken AS, Sales DN, Pedrosa VL. Prevalence of Chlamydia and Gonococcal Infection in Women Assisted in the STI Clinic of Alfredo da Matta Foundation, Manaus, Amazon. *J Bras Doenças Sex Transm* [Internet]. 2010;22(3):129–34. Available from: [http://www.dst.uff.br/revista22-3-2010/Prevalencia clamidia.pdf](http://www.dst.uff.br/revista22-3-2010/Prevalencia%20clamidia.pdf)
 14. Codes JS, Cohen DA, Melo NA, Santos AB, Codes JJG, Junior JCS, et al. STD Screening in a Public Family Planning Clinic in Brazil. *RGOB*. 2002;24(2):101–6.
 15. Santos LM dos, Ulian WL, Trindade JQ, Sousa FDM de, Oliveira JFG, Pereira CCC, et al. Prevalência da infecção endocervical de *Chlamydia trachomatis* em universitárias do estado do Pará, Região Amazônica, Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2017;8(3):27–33.
 16. Fernandes AM dos S, Daher G, Nuzzi RX do P, Petta CA. Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae* among women in a family planning clinic. *Rev Bras Ginecol e Obs*. 2009;31(5):1–6.
 17. Machado MSC, Silva BFB da C e, Gomes ILC, Santana IU, Grassi MFR. Prevalence of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active adolescents from Salvador, Brazil. *Brazilian J Infect Dis*. 2012;16(2):188–91.
 18. Rocha DAP, Filho RAAB, Mariño JM, Santos CMB dos. “Hidden” sexually transmitted infections among women in primary care health services,

- Amazonas, Brazil. *Int J STD AIDS*. 2014;25(12):878–86.
19. Gravningen K, Braaten T SH. Self-perceived risk and prevalent chlamydia infection among adolescents in Norway: a population-based cross-sectional study. *Sex Transm Infect*. 2016;92(2):91–6.
 20. Azulay RD. *Dermatologia*. 6.ed.rev. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015. 468-489 p.
 21. Weir E. Upsurge of genital Chlamydia trachomatis infection. *CMAJ* [Internet]. 2004;171:855. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC522648/>
 22. Miguel M, Temer E, Saúde SDV, Santos AF, Brasileiro I. Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar (PeNSE). Brasil: Ministério da Saúde; 2015. 1-131 p.
 23. Organização Mundial de Saúde. Manual de controle de doenças sexualmente transmissíveis (DST). 1999. p. 55.
 24. Santos C, Sabidó M, Leturiondo L, Ferreira CDO. Development , validation and testing costs of an in-house real- time PCR assay for the detection of Chlamydia trachomatis. *J Med Microbiol*. 2018;66:312–7.
 25. Ljubin-Sternak S, Meštrović T. Chlamydia trachomatis and Genital Mycoplasmas: Pathogens with an Impact on Human Reproductive Health . *J Pathog*. 2014;2014:1–15.
 26. Seadi CF, Oravec R, Von Poser B, Cantarelli V V., Rossetti ML. Diagnóstico laboratorial da infecção pela Chlamydia trachomatis: Vantagens e desvantagens das técnicas. *J Bras Patol e Med Lab*. 2002;38(2):125–33.
 27. Rossetti, Maria Lucia, Cláudia Maria dornelles da Silva JJSR. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular. Guanabara. 2006. 35-38 p.
 28. Stamm WE. Diseases due to Chlamydia. *ACP Med*. 2011;1–6.
 29. Brunham RC. Human immunity to chlamydiae. ASM. Washington, DC; 1999. 11 p.
 30. Mandell GL, Bennet JE DR. Chlamydia trachomatis (trachoma, perinatal infections, lymphogranuloma venereum, and other genital infections). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill. 2014.
 31. Bayramova F, Jacquier N, Greub G. Insight in the biology of Chlamydia-related bacteria. *Microbes Infect* [Internet]. 2018;20(7–8):432–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.008>
 32. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular*. 8ª. Guanabara/Koogan,

- editor. 2005. 332 p.
33. Seshadri R, Adrian L, Fouts DE, Eisen JA, Adam M, Methe BA, et al. Genome Sequence of the PCE-Dechlorinating Bacterium *Dehalococcoides ethenogenes* Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3839946> Linked references are available on JSTOR for this article : 2016;282(May):754–9.
 34. Ripa TPN. A variant of *Chlamydia trachomatis* with deletion in cryptic plasmid: implications for use of PCR diagnostic tests. *Eurosurveillance Wkly Release*. 2006;11.
 35. Ripa T, Nilsson PA. A *Chlamydia trachomatis* strain with a 377-bp deletion in the cryptic plasmid causing false-negative nucleic acid amplification tests. *Sex Transm Dis*. 2007;34(5):255–6.
 36. Gaydos CA, Howell MR, Quinn TC, Gaydos JC, Kee KTMC. Use of Ligase Chain Reaction with Urine versus Cervical Culture for Detection of *Chlamydia trachomatis* in an Asymptomatic Military Population of Pregnant and Nonpregnant Females Attending Papanicolaou Smear Clinics. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1998;36(5):1300–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104818/pdf/jm001300.pdf>
 37. Neves D, Sabidó M, Benzaken NS, Jardim L, Ferreira C, Leturiondo A, et al. Evaluation of screening for *Chlamydia trachomatis* among young women in primary health care services in Manaus , Amazonas State , Brazil Avaliação de rastreamento de *Chlamydia trachomatis* em mulheres jovens em serviços de atenção primária de Manaus , Amazo. *Cad Saúde Pública*. 2016;32(10):1–10.
 38. Hillis SD, Wasserheit JN. Screening for *Chlamydia*: a key to the prevention of pelvic inflammatory disease. *N Engl J Med* [Internet]. 1996;334:1399–401. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199605233342111>
 39. Owusu-Edusei K, Chesson HW, Gift TL, Tao G, Mahajan R, Ocfemia MCB, et al. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sex Transm Dis*. 2013;40(3):197–201.
 40. Bébéar C, Barbeyrac B. Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2009;15(1):4–10. Available from: [sci-hub.tw/10.1111/j.1469-0691.2008.02647.x](http://scihub.tw/10.1111/j.1469-0691.2008.02647.x)
 41. Tamim H, Finan RR, Sharida HE, Rashid M, Almawi WY. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. *Diagn*

- Microbiol Infect Dis. 2002;43(4):277–81.
42. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24(SUPPL. 3):1–10.
 43. Safae Karim, Tiatou Souho MB& BB. Cervical Cancer Induction Enhancement Potential of Chlamydia Trachomatis: A Systematic Review. *Curr Microbiol*. 2018;75:1667–74.
 44. Jespersen DJ, Flatten KS, Jones MF, Smith TF. Prospective Comparison of Cell Cultures and Nucleic Acid Amplification Tests for Laboratory Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005;43(10):5324–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1248517/pdf/1511-05.pdf>
 45. Revista Brasileira Femina. N.gonorrhoeae no Brasil e no mundo [Internet]. 2018. Available from: <https://www.febrasgo.org.br/media/k2/attachments/34Z-ZVolZ46Z-Zn2-Z2018.pdf>
 46. Gyung TC, Jeong SY, Hee BO, Yeong SL, Sun HC, Sang JK, et al. Complete genome sequence of Neisseria gonorrhoeae NCCP11945. *J Bacteriol*. 2008;190(17):6035–6.
 47. Murray PR. Microbiologia médica. 6ª. Elsevier, editor. 2009.
 48. Unemo M, Norlén O, Fredlund H. The porA pseudogene of Neisseria gonorrhoeae - Low level of genetic polymorphism and a few, mainly identical, inactivating mutations. *Apmis*. 2005;113(6):410–9.
 49. Derrick JP, Urwin R, Suker J, Feavers IM, Maiden MCJ. Structural and evolutionary inference from molecular variation in Neisseria porins. *Infect Immun*. 1999;67(5):2406–13.
 50. Whiley DM, Buda PJ, Bayliss J, Cover L, Bates J, Sloots TP. A new confirmatory Neisseria gonorrhoeae real-time PCR assay targeting the porA pseudogene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2004;23(9):705–10.
 51. Tabrizi SN, Chen S, Tapsall J, Garland SM. Evaluation of opa-based real-time PCR for detection of Neisseria gonorrhoeae. *Sex Transm Dis*. 2005;32(3):199–202.
 52. Handsfield HH, Wiesner PJ, Holmes KK. Treatment of the Gonococcal Arthritis-Dermatitis Syndrome. *Ann Intern Med* [Internet]. 1976;84(6):661–7. Available from: <http://annals.org/aim/article-abstract/690321/treatment-gonococcal-arthritis-dermatitis-syndrome>

53. World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections overview and estimates. [Internet]. 2001. Available from: http://www.who.int/hiv/pub/sti/who_hiv_aids_2001.02.pdf
54. Britigan BE, Cohen MS, Sparling FP. Gonococcal infection: A model of molecular pathogenesis. *N Engl J Med* [Internet]. 2010;312(26):1683–94. Available from: sci-hub.tw/10.1056/NEJM198506273122606
55. Ferreira WA, Ferreira CM, Naveca FG, Almeida NCO da S, Vasconcelos W de S, Gomes J de S, et al. Genotyping of two *Neisseria gonorrhoeae* fluoroquinolone-resistant strains in the Brazilian Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(5):629–31.
56. Catarina FDS, Horizonte B. NOTA INFORMATIVA Nº 6-SEI / 2017-COVIG / CGVP /. DIAHV / SVS / MS. Vol. 6. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis; 2017. p. 1–2.
57. Muthukumar A, Zitterkopf NL, Payne D. Molecular Tools for the Detection and Characterization of Bacterial Infections: A Review. *Lab Med*. 2008;39(7):430–6.
58. Adele Visser, Hoosen A. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Lab Anal*. 2006;20(1):8–14.
59. Digene Hybrid Capture 2 CT - ID DNA test [Internet]. Gaithersburg M.D.I; Available from: <https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=6714baaa-2e4d-4f05-875a-41dbb2111c2c&lang=en>
60. Casey CG, Rutledge TF, Johnson DC, Boyd MF, Starr TM. Morbidity and Mortality Weekly Report Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. Vol. 59. Department of health and human services; 2010. 3-116 p.
61. Blair CS, Garner OB, Pedone B, Elias S, Scott Comulada W, Landovitz RJ. Factors associated with repeat rectal *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* screening following inconclusive nucleic acid amplification testing: A potential missed opportunity for screening. *PLoS One*. 2019;14(12):1–7.
62. Dean D, Turingan RS, Thomann H, Zolotova A, Rothschild J, Joseph SJ, et al. A Multiplexed Microfluidic PCR Assay for Sensitive and Specific Point-of-Care Detection of *Chlamydia trachomatis*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;7(12):1–8.
63. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, Crucitti T, Reijans M, Mulders B, et al. Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. *Diagn*

- Microbiol Infect Dis [Internet]. 2011;71(1):29–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.06.005>
64. Levi AW, Beckman D, Hui P, Schofield K, Harigopal M, Chhieng DC. Comparing two methods of detection for *Chlamydia trachomatis* in liquid-based papanicolaou tests. *Am J Clin Pathol*. 2012;138(2):236–40.
 65. Krölov K, Frolova J, Tudoran O, Suhorutsenko J, Lehto T, Sibul H, et al. Sensitive and Rapid Detection of *Chlamydia trachomatis* by Recombinase Polymerase Amplification Directly from Urine Samples. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2014;16(11). Krölov K, Frolova J, Tudoran O, Suhorutsenko J, Lehto T, Sibul H, et al. Sensitive and Rapid Detection of *Chlamydia trachomatis* by Recombinase Polymerase Amplification Directly from Urine Samples. *J Mol Diagnostics* [Internet]. American Society for I):127–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.08.003>
 66. Gaydos CA. Review of use of a new rapid real-time PCR, the cepheid GeneXpert (Xpert) CT/NG assay, for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results for patients while in a clinical setting. *Natl Inst Heal*. 2008;6(9):2166–71.
 67. Perera SR, Khan NH, Martin I, Taheri A, Parti RP, Levett PN, et al. Multiplex Real-time PCR assay for simultaneous identification of *Neisseria gonorrhoeae* and its ciprofloxacin susceptibility status. *J Clin Microbiol*. 2017;55(11):3201–9.
 68. Pickering H, Holland MJ, Last AR, Burton MJ, Burr SE. Evaluation of a *Chlamydia trachomatis* - specific , commercial , real-time PCR for use with ocular swabs. *Parasit Vectors* [Internet]. 2018;11(102):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2686-y>
 69. van Ess EF, Ouburg S, Land JA, Morré SA. Comparison of the Mikrogen multi-target ELISA with the Mikrogen recomLine immunoblot for the detection of *Chlamydia trachomatis* IgG antibodies in serum in infertile women. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2018;150(April):5–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.05.006>
 70. Nye MB, Osiecki J, Lewinski M, Liesenfeld O, Young S, Taylor SN, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* with the cobas CT/NG v2.0 test: performance compared with the BD ProbeTec CT Q x and GC Q x amplified DNA and Aptima AC2 assays. *Sex Transm Infect* [Internet]. 2018;(0):1–7. Available from: <http://sti.bmj.com/lookup/doi/10.1136/sextrans->

2018-053545

71. Hawkins SFC, Paul C. Guest. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. 2017. 125-133 p.
72. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK, et al. Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: Comparison with currently available methods. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2013;17(12). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.07.011>
73. Rumyantseva T, Golparian D, Nilsson CS, Johansson E, Falk M, Fredlund H, et al. Evaluation of the new AmpliSens multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, and *Trichomonas vaginalis*. *Apmis*. 2015;123(10):879–86.
74. Carvalho VG, Terceti MS, Latercia A, Dias T, Paula CR, Lyon JP. Serotype and mating type characterization of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. *Rev Inst Med Trop São Paulo* [Internet]. 2007;49(4):207–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000400002> %0A
75. Wada K, Kubota N, Ito Y, Yagasaki H, Kato K, Yoshikawa T, et al. Simultaneous Quantification of Epstein-Barr Virus , Cytomegalovirus , and Human Herpesvirus 6 DNA in Samples from Transplant Recipients by Multiplex Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1426–32.
76. Hwang K, Ahn JH. Development and validation of multiplex real-time PCR assays for rapid detection of cytomegalovirus , Epstein-Barr virus , and polyomavirus BK in whole blood from transplant candidates. *J Microbiol*. 2018;56(8):593–9.
77. Barcelos MRB, De Vargas PRM, Baroni C, Miranda AE. Infecções genitais em mulheres atendidas em Unidade Básica de Saúde: Prevalência e fatores de risco. *Rev Bras Ginecol e Obstet*. 2008;30(7):349–54.
78. Kevin C. Hazen. Métodos de identificação não baseados em ácidos nucleicos para doenças infecciosas [Internet]. NJ, EUA: Manual MSD & Co. Inc. Kenilworth; 2018. Available from: <https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/doenças-infecciosas/diagnóstico-laboratorial-das-doenças-infecciosas/métodos-de-identificação-não-baseados-em-ácidos-nucleicos-para-doenças-infecciosas>

79. Hjeltnes SO, Olsen ME, Sollid JUE, Haaheim H. A Fast Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Sensitive and Specific Detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA Pseudogene. *J Mol Diagnostics*. 2006;8(5):574–81.
80. Girmatsion Z, Biliczki P, Takac I, Schwerthelm C, Hohnloser SH, Ehrlich JR. N-terminal arginines modulate plasma-membrane localization of Kv7.1/KCNE1 channel complexes. *PLoS One*. 2011;6(11):1–9.
81. Workowski KA, Bolan GA. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *MMWR Recomm Reports*. 2015;64(3):1–138.
82. Meyers D, Wolff T, Gregory K, Marion L, Moyer V, Nelson H, et al. USPSTF recommendations for STI screening. *Am Fam Physician*. 2008;77(6):819–24.
83. Penna GO, Hajjar LA, Braz TM. Gonorréia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000;33(5):451–64.
84. CDC. MMWR Chlamydia testing. [Internet]. Guidelines. 2002. p. 1–27. Available from: [papers3://publication/uuid/3396A926-EB58-4F42-887F-E494892D6FEB](https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5007a1.htm)
85. Whiley DM, Sloots TP. Comparison of three in house multiplex PCR assays for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* using real-time and conventional detection methodologies. *Pathology*. 2005;37(5):364–70.
86. Poiars LDA, Sandrini F. Validation of a *Chlamydia trachomatis* detection method by Real Time Polymerase Chain Reaction. *RBAC*. 2008;40(3):229–32.
87. Abou Tayoun AN, Burchard PR, Caliendo AM, Scherer A, Tsongalis GJ. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis*. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2015;98(2):214–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.011>
88. Safarkar R, Mehrabadi JF, Noormohammadi Z, Mirnejad R. Development a rapid and accurate multiplex real time PCR method for the detection *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma hominis*. *J Clin Lab Anal*. 2017;31(6):1–6.
89. Priyadarshi K, Prakash P, Rani A, Singh SK. Multiplex nested polymerase chain reaction targeting multiple genes for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in genitourinary specimens. *Indian J Sex Transm Dis AIDS*. 2019;40(2):152–8.

90. Ministério da Saúde. Pesquisa de conhecimentos, atitudes e práticas na população brasileira (PCAP). [Internet]. 2016. p. 166. Available from: file:///C:/Users/USUARIO1/Downloads/pcap_2013.pdf
91. Visser M, van Aar F, Koedijk FDH, Kampman CJG, Heijne JCM. Repeat Chlamydia trachomatis testing among heterosexual STI outpatient clinic visitors in the Netherlands: A longitudinal study. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1–11.
92. Wiesenfeld HC. Screening for chlamydia trachomatis infections in women. *N Engl J Med*. 2017;376(8):765–73.
93. Samarawickrema NA, Tabrizi SN, Young E, Gunawardena P, Garland SM. Prevalence of Trichomonas vaginalis, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae and human papillomavirus in a sexual health clinic setting in urban Sri Lanka. *Int J STD AIDS*. 2015;26(10):733–9.
94. Ginocchio CC, Chapin K, Smith JS, Aslanzadeh J, Snook J, Hill CS, et al. Prevalence of Trichomonas vaginalis and coinfection with Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in the United States as determined by the aptima Trichomonas vaginalis nucleic acid amplification assay. *J Clin Microbiol*. 2012;50(8):2601–8.
95. Götz HM, Van Oeffelen LAAM, Hoebe CJPA, Van Benthem BHB. Regional differences in chlamydia and gonorrhoeae positivity rate among heterosexual STI clinic visitors in the Netherlands: Contribution of client and regional characteristics as assessed by cross-sectional surveillance data. *BMJ Open*. 2019;9(1).
96. Di Pietro M, Filardo S, Porpora MG, Recine N, Latino MA, Sessa R. HPV/Chlamydia trachomatis co-infection: Metagenomic analysis of cervical microbiota in asymptomatic women. *New Microbiol*. 2018;41(1):34–41.
97. Seraceni S, Campisciano G, Contini C, Comar M. HPV genotypes distribution in Chlamydia trachomatis co-infection in a large cohort of women from north-east Italy. *J Med Microbiol*. 2016;65(5):406–13.
98. Rob F, Jůzlová K, Kružicová Z, Vaňousová D, Lásiková Š, Sýkorová B, et al. Prevalence of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae co-infections among patients with newly diagnosed syphilis: A single-centre, cross-sectional study. *Cent Eur J Public Health* [Internet]. 2019;27(4):285–91. Available from: <https://doi.org/10.21101/cejph.a5142>
99. Koenig MG, Kosha SL, Doty BL, Heath DG. Direct comparison of the BD

- ProbeTec et system with in-house LightCycler PCR assays for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5751–6.
100. Sachdeva P, Patel AL, Sachdev D, Ali M, Mittal A, Saluja D. Comparison of an In house PCR assay, direct fluorescence assay and Roche AMPLICOR *Chlamydia trachomatis* kit for detection of *C. trachomatis*. *J Med Microbiol.* 2009;58:867–73.
 101. Mangold KA, Regner MA, Tajuddin M, Tajuddin AM, Jennings L, Du H, et al. *Neisseria* species identification assay for the confirmation of *Neisseria gonorrhoeae*-positive results of the COBAS amplicor PCR. *J Clin Microbiol.* 2007;45(5):1403–9.
 102. Ison CA, Golparian D, Saunders P, Chisholm S, Unemo M. Evolution of *Neisseria gonorrhoeae* is a continuing challenge for molecular detection of gonorrhoea: False negative gonococcal *porA* mutants are spreading internationally. *Sex Transm Infect.* 2013;89(3):197–201.
 103. Cruz TP da. Diagnóstico laboratorial e suscetibilidade da *Neisseria gonorrhoeae* aos antibióticos em amostras de corrimento uretral de pacientes atendidos na clínica de IST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas. Manaus, Amazonas.; 2018.
 104. Kuchta T, Krascenicsová K, Bánréti G. Optimization of fluorescence measurement in duplex real-time PCR with TaqMan® probes labeled with VIC and quenched by TAMRA. *Biotechniques.* 2007;42(2):147–9.
 105. Rocco F. Avaliação de metodologias moleculares para diagnóstico das infecções por *Neisseria gonorrhoeae* e por *Chlamydia trachomatis*. Florianópolis - Santa Catarina; 2018.
 106. Black CM, Marrazzo J, Johnson RE. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2002;40(10):3757–63. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed5&NEWS=N&AN=2002357725>
 107. Bristow CC. Comparative Evaluation of 2 Nucleic Acid Amplification Tests for the Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* at Extragenital Sites. Sexually transmitted diseases, United States. *Sex Transm*

- Dis. 2017;44(7):398–400.
108. Gaydos CA, Theodore M, Dalesio N, Wood BJ, Quinn TC. Comparison of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. *J Clin Microbiol.* 2004;42(7):3041–5.

ANEXOS

ANEXO I – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

FUNDAÇÃO ALFREDO DA
MATTA - FUAM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoeae, por qPCR multiplex, em mulheres atendidas na Fundação Alfredo da Matta (FUAM-AM)

Pesquisador: EMILY AGATHA DE MOURA COUTEIRO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03144918.4.0000.0002

Instituição Proponente: Fundação Alfredo da Matta

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.136.099

Outros	CARTA_CEP.docx	21:59:19	MOURA COUTEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Tcle.docx	19/12/2018 21:57:22	EMILY AGATHA DE MOURA COUTEIRO	Aceito
Outros	Declaracao_IST.pdf	08/11/2018 14:00:44	EMILY AGATHA DE MOURA COUTEIRO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_pesquisadores.pdf	08/11/2018 13:46:43	EMILY AGATHA DE MOURA COUTEIRO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	07/11/2018 23:30:16	EMILY AGATHA DE MOURA COUTEIRO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 07 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
LÚCIO FIGUEIRA PIMENTEL
(Coordenador(a))

ANEXO II - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

SECREÇÃO CERVICAL E URETRAL KIT QIAGEN DNAeasy

Preparo da amostra

- 1) Homogeneizar as amostras diretamente do tubo durante 30 segundos em vortex.
- 2) Transferir **200µl** das amostras para um tubo eppendorf 1,5ml identificadas corretamente.

Reação de lise

- 3) Adicionar **200µl de Buffer AL**.
- 4) Adicionar **10µl de Proteinase K**.
- 5) Incubar a 56°C durante 1hora e 30minutos. Vortexar durante 20 segundos.
- 6) Adicionar **200µl de etanol absoluto (96-100%)**. Após isso, fazer um spin.
- 7) Pipetar (P1000) a mistura na coluna de extração QIAGEN e adicionar um tubo coletor.

Extração de DNA

- 8) Centrifugar a coluna com o tubo coletor a 8.000 RPM por 2 minutos.
- 9) Descartar o tubo coletor com o seu conteúdo.
- 10) Colocar a coluna em novo tubo coletor e adicionar **500µl de Buffer AW1** (QIAGEN).
- 11) Centrifugar por 1 minuto a 8.000 RPM.
- 12) Descartar o tubo coletor com o seu conteúdo.
- 13) Colocar a coluna em um novo tubo coletor e adicionar **500µl de Buffer AW2** (QIAGEN).
- 14) Centrifugar 4 minutos a 13.300 RPM, para secar a membrana.
- 15) Descartar o tubo coletor.

Eluição do DNA

- 16) Colocar a coluna em tubo coletor de 1,5ml.
- 17) Adicionar **60µl de Buffer AE** na membrana.
- 18) Incubar em 1 minuto à temperatura ambiente.
- 19) Centrifugar por 2 minutos a 8.000 RPM para eluir o DNA.
- 20) Armazenar o DNA extraído a -20°C.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada como voluntária a participar da pesquisa intitulada: **“DETECÇÃO DE *Chlamydia trachomatis* E *Neisseria gonorrhoeae*, POR qPCR MULTIPLEX, EM MULHERES, ATENDIDAS NA FUNDAÇÃO ALFREDO DA MATTA (FUAM-AM)”** desenvolvida pela Fundação de Dermatologia Tropical e Venereologia Alfredo da Matta (FUAM-AM) localizada na rua Codajás, nº 24, Bairro Cachoeirinha, CEP: 69065-130. Este estudo tem como objetivo descrever o desempenho de um método de diagnóstico molecular eficaz para identificar dois tipos de infecções sexualmente transmissíveis, causadores da doença clamídia e gonorreia.

Para participar da pesquisa, você deverá ser do sexo feminino, ser maior de 18 anos, apresentar ou não corrimento vaginal, ou ter parceiro com presença de corrimento, onde serão classificadas de acordo com a presença (sintomáticas) ou ausência de corrimento vaginal (assintomáticas). Caso aceite, você será examinada e irá realizar uma coleta no Setor de IST, da Fundação Alfredo da Matta (FUAM), com a médica ginecologista ou uma profissional responsável. A coleta será realizada através de um instrumento chamado espéculo esterelizado descartável ou “bico de pato”, e uma escova para coleta endocervical, que será coletada da parede interna da vagina ou do colo do útero e transportada para um tubo específico. Você poderá sofrer um leve desconforto na hora da coleta, mas sem nenhum risco de lesão.

Os resultados servirão para possível implementação do teste na rotina de atendimento no Sistema Único de Saúde(SUS). Serão prestadas todas as orientações necessárias pelo profissional da saúde, e os resultados serão disponibilizados no seu prontuário. As informações fornecidas serão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão, com isso, você não será identificada em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Você terá disponibilidade de novas consultas nesta unidade ou, se necessário, em outros centros de referências regionalizados. O tratamento, quando indicado, seguirá as recomendações do Ministério da Saúde e os medicamentos lhe serão entregues gratuitamente, caso necessário. Você é livre para recusar-se a qualquer momento de participar da pesquisa e retirar seu consentimento, sem prejuízo de atendimento. Solicito a sua autorização para a coleta do material para que este estudo atinja os objetivos propostos. Este documento está em conformidade com a resolução 466/12 CNS/CONEP, que trata do respeito à dignidade humana e o livre consentimento esclarecido do participante.

Declaro que concordo em participar deste estudo com o recebimento de uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ao qual, tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas.

Manaus, _____ de _____ de 2019

Assinatura Voluntária

Assinatura pesquisador

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO ADAPTADO

FUNDAÇÃO ALFREDO DA MATTA

Variáveis epidemiológicas das pacientes do estudo e itens necessários para criação de banco de dados através do programa de software Excel

- Número de ordem de participação do paciente no estudo
- Nome completo da paciente
- Idade da paciente
- Número do prontuário cadastrado na ficha clínica da FUAM
- Apresenta ou não corrimento? Qual tipo? Tipo de corrimento: esbranquiçado, purulento (baseado na entrevista com a paciente e na ficha clínica do setor de IST da FUAM, se necessário).
- Apresenta odor? (quando há presença de corrimento)
- Prurido?
- Disúria?
- Dispareunia (dor nas relações sexuais)? E/ou sangramento durante as relações?
- Apresenta verruga?
- Nº de parceiro fixo e Nº de parceiro nos últimos 3 meses
- Uso de preservativo
- Já teve ou possui algum tipo de IST (Passado venéreo)?
- É contato de parceiro com corrimento uretral?
- Realizou teste para a detecção de clamídia ou gonorreia?
- Já ouviu falar sobre as doenças?

APÊNDICE C - MEMBROS DE PESQUISA

Nome	Profissão	Instituição
Dr. Milton Ozório Moraes	Biólogo	FIOCRUZ/RJ
Dra. Fabíola da Costa Rodrigues	Bióloga	FUAM
Msc. André Luiz Leturiondo	Farmacêutico Bioquímico	FUAM
Msc. Cynthia de Oliveira Ferreira	Farmacêutica Bioquímica	FUAM
Msc. Camila Gurgel dos Santos	Biomédica	FUAM
Flávia de Jesus Padilha	Médica Ginecologista	FUAM
Ana Cláudia A.L. Chaves Camilo	Enfermeira	FUAM
Lucília de Fátima Santana Jardim	Enfermeira	FUAM
Maria de Lourdes Ribeiro	Enfermeira	FUAM

APÊNDICE D – PRODUTO

NOTA TÉCNICA SOBRE A IMPORTÂNCIA DO USO DO ENSAIO MOLECULAR qPCR MULTIPLEX *IN HOUSE* E A IMPLEMENTAÇÃO DO PROTOCOLO NO DIAGNÓSTICO DAS INFECÇÕES CLAMÍDIA E GONORREIA NA ROTINA DA FUNDAÇÃO ALFREDO DA MATTA.

Emily Agatha de Moura Couteiro

Fundação Alfredo da Matta – FUAM

Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Programa de pós-graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia

NOTA TÉCNICA

As infecções sexualmente transmissíveis (IST), acometem mais de um milhão de indivíduos diariamente, principalmente jovens sexualmente ativos (1). Vale ressaltar que a presença de múltiplos parceiros, o sexo sem preservativo e ausência de acesso aos serviços de saúde acarretam na propagação da doença, além de ocasionar graves consequências à vida reprodutiva feminina quando não diagnosticadas precocemente. Apesar da *Chlamydia trachomatis* e da *Neisseria gonorrhoeae*, apresentarem um grande agravo à saúde pública, não são infecções de notificação compulsória, dificultando assim o levantamento epidemiológico destas (2,3).

Alguns métodos convencionais ainda são utilizados para fins de diagnóstico das infecções causadas por clamídia e gonorreia, no entanto, demandam tempo e custo quando comparados à técnica de qPCR *in house*. Esses testes, além de serem mais sensíveis, apresentam menor tempo de execução e menor prazo para a entrega dos resultados do paciente. O CDC preconiza o uso de testes moleculares na rotina em centros de referência para detecção de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* (4). A utilização deste ensaio permite a detecção em indivíduos assintomáticos, e fornece também os requisitos necessários para uma triagem efetiva. Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT), possibilitam alta sensibilidade e

especificidade, além do tempo de processamento ser menor que as técnicas tradicionais, como o isolamento por cultura e o de captura híbrida (5,6). A única desvantagem que os testes moleculares podem apresentar são os gastos elevados dos insumos. No entanto, ainda é possível a redução de reagentes através de concentrações de iniciadores, sondas e volumes utilizados na reação, e consequentemente sendo capazes de reduzir o custo significativamente (7).

As técnicas multiplex vêm ganhando espaço na biologia molecular, pois possuem a capacidade de amplificar dois ou mais alvos simultaneamente, oferecendo um diagnóstico rápido e preciso, além de auxiliar no diagnóstico clínico-laboratorial (8-10). É importante destacar, que esta técnica apresenta normalmente uma alta sensibilidade e especificidade, possibilitando o uso do teste na rotina como método de diagnóstico e diferenciação das infecções clamídia e gonorreia.

No âmbito geral, esta nota técnica tem o objetivo de mostrar a importância do ensaio molecular qPCR multiplex *in house*, podendo detectar simultaneamente os alvos de *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae* em pacientes assintomáticas e consequentemente implementar na rotina laboratorial no centro de referência, Fundação Alfredo da Matta (FUAM). Este teste está contemplado na tabela de procedimentos do Sistema Único de Saúde (SUS) sob o número 02.02.03.009-7 (Detecção de clamídia e gonococo por biologia molecular), no valor de 60 reais por amostra.

Recomendações
Realizar novos estudos na Fundação Alfredo da Matta (FUAM) com protocolos moleculares, com condições de aprimoramento em busca do melhor desempenho no teste, assim como um número amostral maior.
Independentemente do estudo proposto ter sido utilizado por um método <i>in house</i> . É necessário profissionais de saúde capacitados (médicos e enfermeiros) para a solicitação deste ensaio, uma vez que ainda assim sejam testes moleculares com custos elevados.
Torna-se fundamental a utilização deste teste em indivíduos assintomáticos, pois 18,6% não possuíam sintomas sugestivos de infecções por <i>C.trachomatis</i> e <i>N.gonorrhoeae</i> e possuíam o vírus do HPV no colo do útero, podendo ocasionar

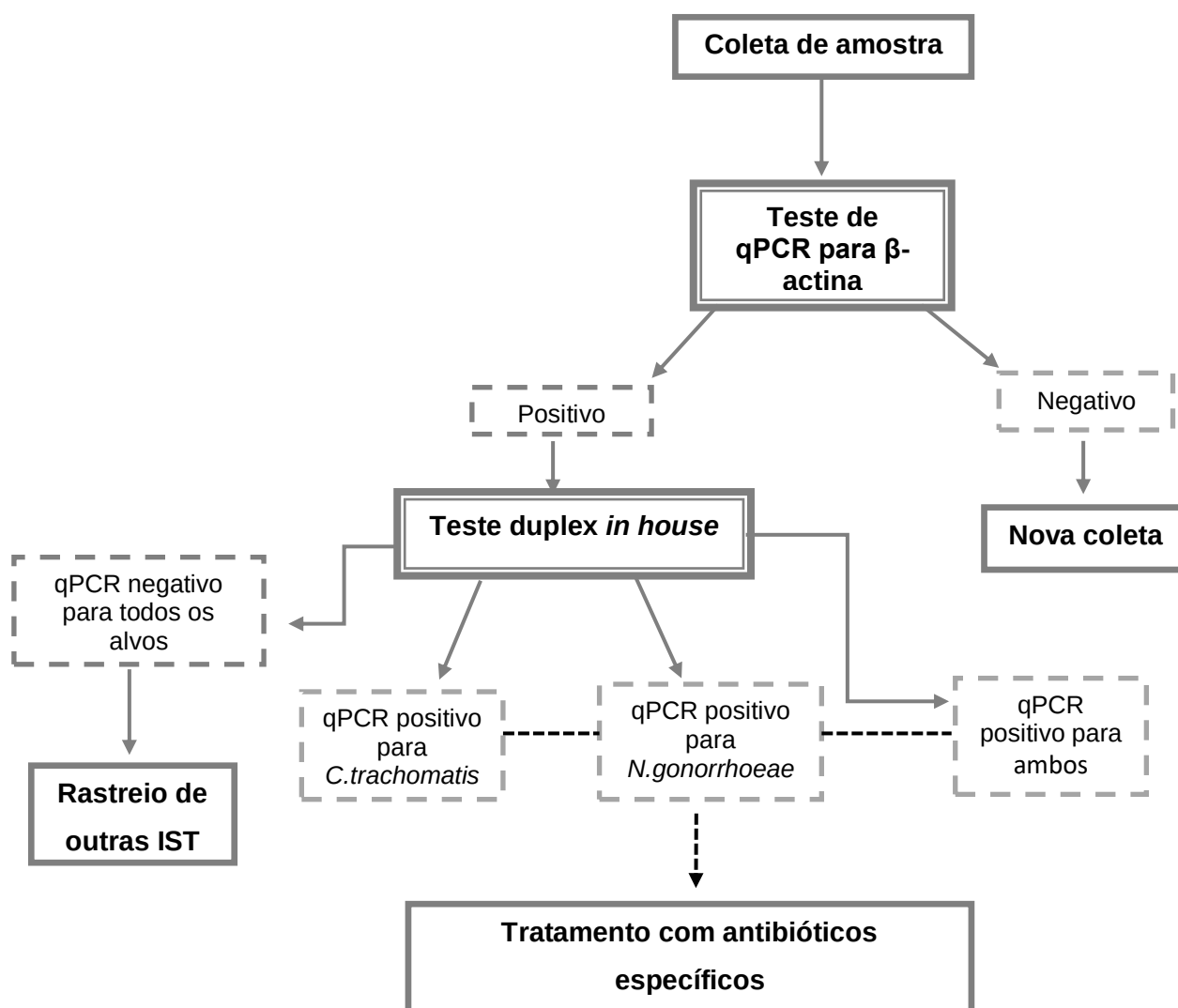
uma série de complicações e até mesmo agravar a situação de uma outra infecção existente.

Promover ações que possam garantir informações sobre outras doenças infecciosas, meios de prevenção e mudança de comportamentos sexuais, com o intuito de reduzir prevenir a disseminação das infecções causadas por *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*, uma vez que sejam porta de entrada para o vírus da imunodeficiência humana (HIV).

Auxiliar no tratamento precoce e específico, consequentemente reduzindo custos e a prevenção de iatrogenias.

PROTOCOLO

- Árvore de classificação voltada ao manejo clínico e laboratorial das infecções causados por *C.trachomatis* e *N.gonorrhoeae*.



➤ Procedimento Operacional Padrão (POP)

	LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR	Elaborado:	Rev.:	Nº:
		Aprovado:	Data:	Fl(s):
PROCEDIMENTO: PCR em tempo real (qPCR) multiplex <i>in house</i>, por método duplex, na detecção das bactérias <i>C.trachomatis</i> e <i>N.gonorrhoeae</i> SECREÇÃO URETRAL E CERVICAL				

1. DESCRIÇÃO DO EQUIPAMENTO

O sistema de PCR em tempo real (qPCR) StepOnePlus™ (Applied Biosystems), é um instrumento de que contém 96 poços perfeito para usuários iniciantes e experientes. Este sistema pode ser configurado em uma variedade de configurações e vem pronto para uso imediato, com software intuitivo de análise de dados e controle de instrumentos. Utilizando robusta gravação óptica de 4 cores com base em LED, o sistema qPCR foi projetado para fornecer resultados precisos e quantitativo para uma variedade de aplicações de pesquisa genômica.

2. INSTRUÇÕES:

1. Realizar o procedimento deste ensaio com cautela em todas as etapas;
2. Os responsáveis em executar este procedimento são os Técnicos de Laboratório ou Farmacêuticos, salvo em situações onde seja necessário a realização do teste por profissionais aptos em procedimentos de biologia molecular;
3. Antes de realizar a tarefa que se segue, certifique-se de que dispõe de todo material necessário para executá-lo, e ainda que os mesmos estejam na validade;
4. Utilizar Equipamentos de Proteção Individual (EPI);
5. Observar as Normas de Biossegurança;
6. Não realizar este procedimento, caso o material biológico não tenha passado pelo processo inicial (extração de DNA);
7. Checar se há problemas no funcionamento do equipamento, assim como as condições de termociclagem;
8. Diante de qualquer não conformidade, anotá-la e comunicá-la ao Responsável Técnico e/ou ao Sub-Gerente, Gerente de Laboratórios.

3. EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPI):

Jalecos de mangas longas, luvas de procedimento em látex, máscara e/ou protetor facial, toucas descartáveis e óculos de proteção, quando necessários.

4. ESPAÇO FÍSICO:

Sala especializada para procedimentos de PCR (preparo das reações, preparo das amostras e análise do ensaio). Esta sala, deve ser climatizada e bem iluminada, além de conter mesa de apoio para colocação dos materiais de uso, cabine de PCR e cesto de lixo para amostras biológicas.

5. HIGIENE E CONSERVAÇÃO DE MATERIAIS E AMBIENTE:

- 1. Certificar-se de que as mesas de apoio estão limpos;*
- 2. Certificar-se de que a lamparina está abastecida;*
- 3. Certificar-se de que há recipientes para descarte dos materiais perfuro cortantes;*
- 4. Certificar-se de que a lixeira está com saco plástico de 1º uso;*
- 5. Realizar o descarte dos materiais infecciosos adequadamente em recipiente apropriado;*
- 6. Ao término das atividades, realizar a desinfecção das superfícies utilizadas como apoio com solução de hipoclorito de sódio a 2% ou álcool etílico a 70%;*

6. MATERIAIS NECESSÁRIOS:

- 1. Pincel permanente;*
- 2. Tubos Eppendorff 1,5mL;*
- 3. Placa RT-PCR (Life Technologies);*
- 4. Pipetas;*
- 5. Ponteiras;*
- 6. Suporte para amostras;*
- 7. Filme adesivo para vedação das placas.*

7. PROCEDIMENTOS TÉCNICOS:

7.1 Reagentes

REAGENTES	X1*
H ₂ O	3,2 µL
TaqMan Universal PCR Master Mix (<i>Applied Biosystem</i>)	10 µL
Primer Forward e Reverse do alvo plasmídeo críptico (<i>C.trachomatis</i>) – 300 nM (0,3 µM)	0,6 µL
Primer Forward e Reverse do alvo <i>porA</i> (<i>N.gonorrhoeae</i>) – 300 nM (0,3 µM)	0,6 µL
Sonda plasmídeo críptico (<i>C.trachomatis</i>) – 200 nM (0,2 µM)	0,2 µL
Sonda <i>porA</i> (<i>N.gonorrhoeae</i>) - 200 nM (0,2 µM)	0,2 µL
DNA	4 µL
Total	20 µL

*Reação por amostra em duplex

7.2 Preparo das reações:

7.2.1 Cabine de PCR

1. Utilizar Equipamentos de Proteção Individual (EPI)
2. Ligar a radiação ultravioleta (UV) na cabine de PCR por aproximadamente 15 minutos antes do procedimento;
3. Desligar a UV antes do iniciar o procedimento;
4. Antes de realizar a tarefa que se segue, certifique-se de que dispõe de todo material necessário para executá-lo, e ainda que os mesmos estejam na validade;
5. Utilizar Equipamentos de Proteção Individual (EPI);
6. Identificar corretamente o tubo eppendorff para inserir cada reagente necessário para este ensaio (MIX);
7. O mix deve conter os pares de iniciadores F e R da *C.trachomatis* (Pasmídeo Críptico) e da *N.gonorrhoeae* (*porA*) e suas respectivas sondas, H₂O e o Master Mix, de acordo com as concentrações padronizadas, assim como a quantidade de amostras testadas no dia;
8. Aplicar o mix de reação nos poços na placa de PCR em tempo real (qPCR) com auxílio de pipetas e ponteiras e tampar com papel alumínio para evitar contaminação durante o transporte de uma sala à outra;
9. Descartar o material utilizado como: tubo de eppendorff para o mix das reações e as ponteiras;

10. Guardar os pares de iniciadores, sondas e o H₂O em uma temperatura a -20°C, diferentemente do master mix que deve ser guardado em uma temperatura de aproximadamente 9°C;
11. Limpar e Organizar a cabine de PCR antes de sair da sala;
12. Ligar novamente a UV na cabine de PCR;
13. Não é recomendado a saída da cabine de PCR e da sala durante a realização do procedimento, pois há chances de contaminação;
14. Também não é recomendado permanecer na sala enquanto a luz UV estiver ligada;
15. Ir para uma outra sala de procedimentos do laboratório para a aplicação do DNA na placa;
16. Diante de qualquer não conformidade, anotá-la e comunicá-la ao Responsável Técnico e/ou ao Sub-Gerente, Gerente de Laboratórios.

7.2.2 Aplicação do DNA na placa de qPCR

1. Limpar a bancada com álcool 70% e organizar as pipetas, ponteiros e lixo para descarte de amostras biológicas;
2. Organizar as amostras biológicas que serão utilizadas na bancada;
3. Aplicar 4 µL de DNA de cada paciente conforme foi aplicado na placa de qPCR, para identificação e análise dos resultados;
4. Vedar com filme adesivo específico a placa de qPCR;
5. Centrifugar a placa em 3.000rpm por 30 segundos
6. Colocar a placa para rodar no equipamento de qPCR;
7. Limpar novamente a bancada com álcool 70%.

7.2.3 Rodar placa de qPCR no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems)

1. Ligar o equipamento StepOne Plus;
2. Identificar o experimento e a corrida do instrumento (Padrão – tempo estimado de 1 a 2 horas até o término do teste);
3. Desenhar a placa de qPCR através do programa StepOne Software v2.1 com os respectivos alvos;
4. Inserir a placa de qPCR já centrifugada no equipamento;
5. Verificar as condições termocíclicas (2 min a 50 ° C e 10 min a 95 ° C, seguidas de 40 ciclos de 15s a 95° C e a 60 ° C);
6. Descartar o jaleco, luvas, touca e máscara;
7. Aguardar o término do teste.

7.3 Interpretação dos resultados

1. Interpretar e registrar os resultados encontrados;
2. Gerar um laudo e entregar ao profissional especializado no setor de IST da FUAM, para que o paciente receba o tratamento imediato, se necessário.

RESULTADOS	
<i>C.trachomatis</i> (plasmídeo críptico)	<i>N.gonorrhoeae</i> (<i>porA</i>)
Ct (cycle threshold) $\leq$ 35,7 POSITIVO	Ct (cycle threshold) $\leq$ 36,6 POSITIVO
Ct (cycle threshold) $>$ 35,7 NEGATIVO	Ct (cycle threshold) $>$ 35,7 NEGATIVO

7.4 Gene constitutivo humano (β -actina)

Vale ressaltar que antes da realização do ensaio em duplex, é necessário realizar o teste molecular de qPCR na detecção do gene constitutivo humano (β -actina - ACTB), assim como é feito para os demais patógenos no laboratório de biologia molecular da Fundação Alfredo da Matta. A utilização deste alvo em ensaios moleculares, possibilita uma melhor análise, pois serve como controle de qualidade das amostras.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Management of sexually transmitted diseases [Internet]. Genebra, Suíça: World Health Organization (WHO); 2005. Available from: <http://www.who.int/hiv/pub/sti/pub6/en/>
2. Azulay RD. Dermatologia. 6.ed.rev. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2015. 468-489 p.
3. Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST A e HV. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para atenção integral as pessoas com infecções sexualmente transmissíveis [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. Available from: bvsms.saude.gov.br/.../protocolo_clinico_diretrizes_terapeutica_atencao_integr_al_pess
4. Marques CA, Menezes MLB. Infecção Genital por Chlamydia trachomatis e Esterilidade [Internet]. 2005 [cited 2018 Oct 2]. Available from: <http://www.dst.uff.br/revista17-1-2005/infeccaogenital.pdf>
5. Organização Mundial de Saúde. Manual de controle de doenças sexualmente transmissíveis (DST). 1999. p. 55.
6. World Health Organization (WHO). Laboratory diagnosis of sexually transmitted infections, including human immunodeficiency virus. 2013.
7. Santos C, Sabidó M, Leturiondo L, Ferreira CDO. Development , validation and testing costs of an in-house real- time PCR assay for the detection of Chlamydia trachomatis. J Med Microbiol. 2018;66:312–7.
8. Hwang K, Ahn JH. Development and validation of multiplex real-time PCR assays for rapid detection of cytomegalovirus , Epstein-Barr virus , and polyomavirus BK in whole blood from transplant candidates. J Microbiol. 2018;56(8):593–9.
9. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK, et al. Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: Comparison with currently available methods. Int J Infect Dis [Internet]. 2013;17(12). Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.07.011>
10. Safarkar R, Mehrabadi JF, Noormohammadi Z, Mirnejad R. Development a rapid and accurate multiplex real time PCR method for the detection Chlamydia

trachomatis and *Mycoplasma hominis*. J Clin Lab Anal. 2017;31(6):1–6.