



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

**PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENOTÍPICA DE *Chlamydia trachomatis* EM  
AMOSTRAS CERVICAIS DE ESTUDANTES UNIVERSITÁRIAS EM BELÉM,  
PARÁ, BRASIL**

BELÉM

2015

LEONARDO MIRANDA DOS SANTOS

**PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENOTÍPICA DE *Chlamydia trachomatis* EM  
AMOSTRAS CERVICAIS DE ESTUDANTES UNIVERSITÁRIAS EM BELÉM,  
PARÁ, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Patologia das Doenças Tropicais.

Orientação: Maísa Silva de Sousa.

BELÉM  
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Santos, Leonardo Miranda, 1987-

Prevalência e variabilidade genotípica de chlamydia trachomatis em amostras cervicais de estudantes universitárias em Belém, Pará, Brasil / Leonardo Miranda Santos. - 2015.

Orientadora: Máisa Silva Sousa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2015.

1. Chlamydia trachomatis - Belém (PA). 2. Doenças sexualmente transmissíveis - Belém (PA). 3. Infecções por - Belém (PA). 4. Estudantes universitárias - Belém (PA). I. Título.

CDD 22. ed. 616.9235

---



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

LEONARDO MIRANDA DOS SANTOS

**PREVALÊNCIA E VARIABILIDADE GENOTÍPICA DE *Chlamydia trachomatis* EM  
AMOSTRAS CERVICAIS DE ESTUDANTES UNIVERSITÁRIAS EM BELÉM,  
PARÁ, BRASIL**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção de título de Mestre em Doenças Tropicais

Aprovada em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>ª</sup> Máisa Silva de Sousa, Dr.  
*Orientadora-NMT/ UFPA*

---

Prof<sup>ª</sup> Edna Aoba Yassui Ishikawa, Dr.  
*Membro Titular-NMT/UFPA*

---

Prof<sup>º</sup> Luiz Fernando Almeida Machado, Dr.  
*Membro Titular-ICB/ UFPA*

---

Prof<sup>ª</sup> Cintya de Oliveira Souza, Dr.  
*Membro Titular-IEC/PA*

---

Prof<sup>ª</sup> Fabíola Elizabeth Vilanova, Dr.  
*Membro Suplente-NMT/UFPA*

Dedico este trabalho a todos os  
familiares pelo apoio no  
desenvolvimento do mesmo.

## AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo, pelo infinito Amor, companheirismo, aprendizado e atenção.

A os meus pais Francisco de Assis dos Santos e Maria das Dores Miranda dos Santos pelo amor incondicional e recíproco.

A todos os meus Familiares pelo carinho.

A Prof<sup>a</sup> Luiza Antonia Seabra Portal pela compreensão e consideração.

A Dr<sup>a</sup> Danielle Murici pelo apoio na finalização deste trabalho.

A Dr<sup>a</sup> Karla Lima pelo incentivo desde o começo.

A Dr<sup>a</sup> Maísa Sousa pela orientação, gratidão, aprendizado e amizade.

A Dr<sup>a</sup> Luisa Carício pela consideração e amizade.

A Dr<sup>a</sup> Edna Ishikawa pela amizade e aprendizado.

Ao Dr Givago Souza pelo apoio e amizade.

A Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Martins pelo carinho e reconhecimento.

A os profissionais do Laboratório de Citopatologia/UFPa pela colaboração.

A todos os profissionais e amigos do Núcleo de Medicina Tropical pela atenção e amizade.

A todos os meus amigos, que são muitos (Graças a Deus!!), como os do LabMol (Akim Nobre, Louise, Renata, Camila, Patrick, Yago, Henrrique, Josinaide, Bruna, Jaciana, Ingrid, Maria, Joaquim, Danilo, Rodrigo, Alisson); Amigos de curso (Helder, Paulo, Geraldo, Joyce, Nayana, Tatiane, Rodrigo, Clívia). Aos amigos da academia Espaço do Corpo.

A todos os meus amigos que direto e/ou indiretamente me ajudaram, e muito, para concluir mais uma etapa na minha vida.

Muito obrigado a todos, de coração!

*“Quem conhece a sua ignorância  
revela a mais profunda sapiência,  
quem ignora a sua ignorância  
vive na mais profunda ilusão.”*

*Lao-Tsé*

## Resumo

A infecção por *Chlamydia trachomatis* é a Infecção Sexualmente Transmissível (IST) bacteriana mais prevalente no mundo, podendo ser assintomática em até 80% dos casos, e associa-se às complicações tardias. As jovens universitárias fazem parte de uma demanda diferenciada da população por apresentarem alto grau de escolaridade. Objetivo foi verificar a prevalência e a variabilidade dos genótipos de *C. trachomatis* em infecção cervical das estudantes de universidade pública do estado do Pará, Brasil, e avaliar a associação deste às respectivas características socio-comportamentais e de queixas ginecológicas. Foram incluídas 438 estudantes universitárias entre setembro de 2012 a outubro de 2014 e as amostras endocervicais foram obtidas durante exame ginecológico. Realizou-se a técnica de fenol-clorofórmio para a extração de DNA total da amostra de secreção cervical, e para a detecção de *C. trachomatis*, utilizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do tipo *seminested*-PCR para amplificação de 224pb do gene *omp1*. Para a identificação dos genótipos, realizou-se uma *Nested*-PCR, para a amplificação de 990pb do gene *omp1*, no qual, foi purificada e submetida ao sequenciador ABI3130, posteriormente as sequências nucleotídicas foram comparadas com as depositadas no *GenBank*. A prevalência da infecção cervical por *C. trachomatis* foi de 12,5% (IC: 95%  $\pm$ 5,89) e os genótipos identificados foram o genótipo J(36,3%), seguido dos genótipos D (18,2%), E (18,2%), F (18,2%) e Ia (9,1%). Não houve associação significativa para a idade, início da vida sexual, número de parceiros, se usam preservativo camisinha, presença de queixas ginecológicas e de genótipos encontrados na população de estudo. Embora a prevalência encontrada apresentar-se alta entre as estudantes universitárias, a falta de significância estatística pode ser devido ao número amostral pequeno e/ou consequência de respostas socialmente aceitáveis. Esforços sejam feitos para que a ampliação do rastreamento da infecção por *C. trachomatis* em populações restritas.

**Palavras-chave:** *Chlamydia trachomatis*, genotipagem, estudantes universitárias.



## Abstract

Infection with *Chlamydia trachomatis* is a Sexually Transmitted Infection (STI) more prevalent bacterial in the world and can be asymptomatic in up to 80% of cases and is associated with late complications. The university students are part of a differentiated demand of the population for their high level of education. Objective was to assess the prevalence and variability of the genotypes of *C. trachomatis* in cervical infection of public university students in the state of Pará, Brazil, and to evaluate the association of the respective socio-behavioral characteristics and gynecological complaints. They included 438 college students from September 2012 to October 2014 and cervical samples were obtained during gynecological examination. It was performed phenol-chloroform technique for extracting total DNA from the sample cervical secretion, and for the detection of *C. trachomatis* used the Polymerase Chain Reaction (PCR) PCR-seminested the type for amplification 224pb gene omp1. For the identification of genotypes, we carried out a nested PCR for the amplification of the gene omp1 990pb, which was purified and subjected to ABI3130 sequencer, then the nucleotide sequences were compared with *GenBank*. The prevalence of cervical infection by *C. trachomatis* was 12.5% (CI: 95%  $\pm$  5.89) and genotypes were identified J genotype (36.3%), followed by D genotypes (18.2%) E (18.2%), F (18.2%) and Ia (9.1%). There was no significant association for age, first sexual intercourse, number of partners, and condoms are used, the presence of gynecological complaints and genotypes found in the study population. Although the prevalence found present itself high among university students, the lack of statistical significance may be due to small sample size and/or result in socially acceptable answers. Efforts are made to trace the expansion of *C. trachomatis* infection in restricted populations.

**Keywords:** *Chlamydia trachomatis*, genotyping, university students.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b> Comparação entre a antiga e atual taxonomia de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	25
<b>Figura 02:</b> Árvore genealógica demonstrando o limiar de parentesco entre espécies do gênero <i>Chlamydia</i> .....	26
<b>Figura 03:</b> Genótipos da <i>Chlamydia trachomatis</i> classificadas de acordo com o perfil da infecção.....	28
<b>Figura 04:</b> Ciclo biológico da <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	29
<b>Figura 05:</b> Formas morfológicas da <i>Chlamydia trachomatis</i> em vesícula de inclusão, corpo reticular (CR) e corpo elementar (CE), em destaque o plasmídeo com as oito ORFs, e o ORF5 que codifica pgp3.....	32
<b>Figura 06:</b> Box Plot da média e desvio padrão da idade das estudantes universitárias positivas e negativas para a infecção cervical por <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	51
<b>Figura 07:</b> Foto documentação da amplificação do fragmento de 270pb do gene $\beta$ -globina humana em gel de agarose a 1%.....	52
<b>Figura 08:</b> Foto documentação da amplificação do fragmento de 224pb do gene <i>omp1</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> em gel de agarose a 1%.....	52
<b>Figura 09:</b> Foto documentação da amplificação do fragmento de 990pb do gene <i>omp1</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> em gel de agarose a 1%.....	53
<b>Figura 10:</b> Árvore filogenética das cepas de <i>Chlamydia trachomatis</i> detectadas em amostras de secreção cervical de estudantes universitárias e as disponíveis no <i>GenBank</i> ; amostras utilizadas no estudo (249, 78, 72, 144, 15, 91, 53, 129, 216, 911).....	56

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1- Características socio-epidemiológicas das estudantes universitárias em Belém, Pará, Brasil. (n=438).....55**

**Tabela 2- Queixas ginecológicas das estudantes universitárias em Belém, Pará, Brasil (438).....55**

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 01:** Número total de casos notificados de *Chlamydia trachomatis*, gonorreia e sífilis nos países europeus em 1990-1999, 2000-2008 e 2009..... 23
- Quadro 02:** Sequência de *primers* utilizados para a detecção do fragmento de 224 pb do gene *omp1* da *Chlamydia trachomatis*..... 44
- Quadro 03:** Sequência de *primers* utilizados para amplificação de 990 pb do gene *omp1* da *Chlamydia trachomatis* para sequenciamento..... 45
- Quadro 04:** Sequências do gene *omp1* da *Chlamydia trachomatis* depositados no *GenBank* e utilizadas para comparação com as sequências do estudo..... 48
- Quadro 05:** Genótipos encontrados em amostras de secreção cervical e características sócio-epidemiológicas e de queixas ginecológicas das estudantes universitárias positivas para a infecção por CT. Para sim (X) e não (-)..... 57

## LISTA DE ABREVEATURAS

ADP	Adenosina Difosfato
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
ASHA	American Social Health Association
ATP	Adenosina Trifosfato
BGMK	<i>Buffalo Green Monkey Kidney Cells</i>
CDC	Center For Disease Control and Prevention
CE	Corpo Elementar
CHSP60	<i>Chlamydial Heat Shock Protein 60</i>
CR	Corpo Reticular
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
ddNTP	Didesoxinucleotídeo
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotidos Trifosfato
ECDC	European Center For Disease Prevention and Control
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GM-CSF	Fator Estimulante de Macrófago granulócito
GROA	Oncogenes Relacionados ao Crescimento
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPV	Papilomavírus Humano
ICN	Conjuntivite de Inclusão de Neonatos
IFD	Imunofluorescência Direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-1 $\alpha$	Interleucina 1 alfa
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
Kb	Kilobase
K $\beta$	Fator Nuclear Kapa-beta
LBMOL	Laboratório de Biologia Molecular e Celular
LPS	Lipopolissacarídeos
MIF	Microimunofluorescência
MOMP	<i>Mayor Outer Membrane Protein</i>
NAATs	Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos
NaCl	Cloreto de Sódio
NAP	Peptídeo Antimicrobiano Natural
NK	<i>Natural Killer</i>

NMT	Núcleo de Medicina Tropical
NODs	Domínios de Oligomerização
ORFs	<i>Open reading frame</i>
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
Pmol	Picomol
POC	Point-of-care
RFLP	<i>Restriction Fragmente Lenght Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucleico ribossômico
Rpm	Rotações por minutos
s	Segundos
SCDs	Codificações Previstas
SLPI	Inibidor da Secreção de Proteinase por Leucócito
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tris + EDTA
Th1	Células Linfocitárias Th1
Th2	Células Linfocitárias Th2
TLKs	<i>Toll-likes</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Luz ultravioleta
V	Volts
VD	Domínio Variável
W	Watts
ZP	Zona de Plasticidade
µm	Micrometro
°C	Grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	21
3.1 GERAL.....	21
3.2 ESPECÍFICOS .....	21
<b>4 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	22
4.1 INFECCÕES SEXUAIS POR <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	22
<b>4.1.1 Histórico</b> .....	22
<b>4.1.2 Epidemiologia</b> .....	22
<b>4.1.3 O agente etiológico</b> .....	24
4.1.3.1 Taxonomia de <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	24
4.1.3.2 Aspectos morfofuncionais .....	26
4.1.3.3 Ciclo biológico .....	28
4.1.3.4 Aspectos genômicos .....	30
4.1.3.5 Resposta imunológica.....	32
4.1.3.6 Genótipos.....	34
<b>4.1.4 Manifestações clínicas e complicações</b> .....	35
<b>4.1.5 Transmissão</b> .....	36
<b>4.1.6 Fatores de risco</b> .....	37
<b>4.1.7 Diagnóstico</b> .....	37
4.1.7.1 Cultura bacteriológica .....	37
4.1.7.2 Testes imunoenzimáticos.....	38
4.1.7.3 Imunofluorescência direta .....	38
4.1.7.4 Imunofluorescência indireta .....	39
4.1.7.5 Técnicas moleculares.....	39
<b>4.1.8 Tratamento</b> .....	40
<b>4.1.9 Controle</b> .....	41

<b>5 METODOLOGIA</b> .....	42
5.1 TIPO DE ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA .....	42
5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	42
5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	42
5.4 ETAPAS DO ESTUDO.....	42
<b>5.4.1 Coleta do material</b> .....	42
<b>5.4.2 Protocolo de extração de DNA genômico</b> .....	43
<b>5.4.3 Protocolo de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR)</b> .....	43
5.4.3.1 Amplificação do gene da $\beta$ -globina humana .....	43
5.4.3.2 Detecção do gene <i>omp1</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> . .....	44
5.4.3.3 Amplificação do fragmento de <i>omp1</i> de <i>Chlamydia trachomatis</i> para a sequenciamento. ....	45
5.4.3.4 Eletroforese.....	46
5.4.3.5 Purificação dos produtos da <i>Nested-PCR</i> .....	46
5.4.3.6 Reação de Sequenciamento .....	46
5.4.3.7 Precipitação do produto da reação de sequenciamento .....	47
<b>5.4.4 Eletroforese capilar do DNA sequenciado</b> .....	47
<b>5.4.5 Análise das sequências</b> .....	47
<b>5.4.6 Local da realização das diferentes etapas</b> .....	48
<b>5.4.7 Descrição das variáveis e/ou indicadores do estudo e o processo de obtenção dos dados</b> .....	49
5.5 NORMAS ÉTICAS .....	49
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>6 RESULTADOS</b> .....	51
6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO INVESTIGADA .....	51
6.2 DETECÇÃO MOLECULAR DA <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	51
6.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE <i>Chlamydia trachomatis</i> .....	53



6.4 CARACTERÍSTICAS SOCIO-EPIDEMIOLOGICAS DAS ESTUDANTES POSITIVAS PARA A INFECÇÃO.....	53
6.5 QUEIXAS GINECOLÓGICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	54
6.6 GENÓTIPOS E OS FATORES EPIDEMIOLÓGICOS E DE QUEIXA GINECOLÓGICA IDENTIFICADOS.....	55
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>64</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>79</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) ainda são um grande problema de saúde pública que acometem principalmente adolescentes e adultos jovens sexualmente ativos. As infecções genitais por *Chlamydia trachomatis* (CT) estão frequentemente associadas ou são causa da maioria destas IST (SILVA, 2011; TRAVASSOS *et al*, 2012). A infecção genital por CT evolui com caráter assintomático em até 80% dos casos, favorecendo o desenvolvimento de cervicite, lesões cervicais crônicas, tais como doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez tubária, abortos espontâneos, cancro uterino e esterilidade feminina (ELEUTÉRIO *et al*, 2007; BAUD *et al*, 2011; GEISLER & STAHHM, 2011; MANIA-PRAMANIK *et al*, 2012).

A infecção por CT é a IST mais frequente no mundo, e de acordo com o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) em 2013 estudos evidenciaram, nos Estados Unidos, 623 casos para cada 100.000 mulheres (CDC, 2014). Na Europa e nos países de Zimbaube, Rússia, China, Peru e Austrália verificou-se que em populações variadas a infecção por CT representa o maior índice de prevalência entre as ISTs (ECDC 2011; DETELS *et al*, 2011; LEWIS *et al*, 2012).

Sendo a causa mais comum de infertilidade evitável no mundo, a infecção genital por CT também se mostra como cofator que aumenta a exposição à contaminação pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e influencia o desenvolvimento de Adenocarcinoma cervical por Papilomavírus Humano (HPV), bem como é fator de risco para infecções genitais de outras etiologias (MADELEINE *et al*, 2007; MALHOTRA *et al*, 2013; NAKASHIMA *et al*, 2014). Infecções por CT apresentam elevado índice de complicação para a saúde reprodutiva por acometerem de forma particular, mulheres jovens que naturalmente podem se encontrar em alto período reprodutível (JALIL *et al*, 2008; BENZAKEN *et al*, 2010).

A CT é uma bactéria de aproximadamente 1,3 µm de diâmetro, possui genoma pequeno de 1.042.519 pares de bases, com um plasmídeo críptico de 7,5 kb que pode estar associado a fatores de virulência. Possui membrana celular externa e interna, é considerado uma bactéria parasita intracelular obrigatória que se apresenta em 19 tipos, conhecidos como genótipos que se estendem do A ao L, porém os genovares D ao K são os mais associados às infecções genitais devido ao tropismo por células epiteliais colunares do trato genital masculino e feminino (QUINT *et al*, 2011; HARRIS *et al*, 2012).

Os genovares que causam infecções sexuais mais prevalentes mundialmente são o D, F, E, G, e os estudos com populações variadas mostram que há significativa associação entre

estes genótipos e mulheres com idade inferior a 25 anos, que por motivos socioeconômicos e comportamentais apresentam elevada frequência de exposição e conseqüentemente aumento dos riscos de contaminação por ISTs (PIÑEIRO *et al*, 2009; PETROVAY *et al*, 2009; BENI *et al*, 2010; MACHADO *et al*, 2011; MEJUTO *et al*, 2013).

Devido à transmissão ser por via sexual, a prevenção deste patógeno baseia-se fundamentalmente em medidas de educação em saúde, além do uso dos métodos de barreira, como a camisinha e do rastreamento por técnicas de biologia molecular (OLIVEIRA *et al*, 2010; TRAVASSOS *et al*, 2012).

## 2 JUSTIFICATIVA

De acordo com Gottlieb *et al* (2010) os programas de controle de infecções por CT são baseados principalmente na triagem de infecção assintomática, prevalente em mulheres jovens sexualmente ativas, dando ênfase a identificação e prevenção de lesões crônicas recorrentes. Como a infecção cervical por CT adquire evolução assintomática em 80% dos casos, a mesma, contribui para uma epidemiologia do tipo silenciosa (MARKLE *et al*, 2013).

As jovens universitárias fazem parte de uma demanda diferenciada da população por estarem em processo de aquisição e produção de conhecimento de diferentes aspectos, porém, esta característica pode ou não contribuir para seu modo de vida, maneira de prevenção e cuidado à saúde (JAMES *et al*, 2008). O relato dos casos de infecções deste tipo é bastante variado entre os países, devido aos diferentes esquemas de rastreamento e controle entre os mesmos, porém em países onde não há esquemas de rastreio, os relatos dos casos são baseados na triagem no diagnóstico hospitalar quando associado a outras patologias do trato reprodutivo (BENDER *et al*, 2011).

No Brasil ainda não há programas de rastreio de infecções genitais por CT, mas de acordo com estudos em populações brasileiras variadas, o índice destas infecções varia de 5,0% a 31% entre os jovens que frequentam ambulatórios e clínicas ginecológicas e, mesmo sendo uma infecção silenciosa, os genótipos D, F e E estão entre os mais prevalentes. Não há relatos de trabalhos que abordem a genotipagem de CT em infecções genitais em jovens estudantes universitárias na região Norte do Brasil (LIMA *et al*, 2007; MACHADO *et al*, 2012).

O presente trabalho é importante ferramenta para medidas de vigilância em saúde, pois detectará a prevalência e a diversidade genotípica de CT de modo a permitir uma análise do padrão genético de cada genótipo encontrado e a associação destes às condições sócio-epidemiológicas e de queixas ginecológicas em que se encontram as estudantes universitárias. Além de que fornece informações importantes que ampliam a observação sobre as estirpes circulantes e possibilita a exploração das diferenças nas manifestações clínicas entre as universitárias e os genótipos identificados

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

- Identificar a prevalência e a variabilidade genotípica de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais de estudantes universitárias de Belém do Pará, Brasil.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar a população investigada;
- Verificar quais fatores sócio-epidemiológicos e de queixas ginecológicas associadas à infecção cervical por *Chlamydia trachomatis* nas estudantes universitárias.

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 INFECÇÕES SEXUAIS POR *Chlamydia trachomatis*.

#### 4.1.1 Histórico

“A palavra “clamídia” vem da palavra grega “ chlamys ”, que significa " manto envolto em torno do ombro ", devido envolver-se no meio intracelular. Em 1907, Halberstaedter e Prowazec identificaram primeiramente CT a partir da observação de inclusões citoplasmáticas de material oriundo da conjuntiva de primatas não humanos afetados por tracoma humano (HALBERSTAEDTER & PROWAZEC, 1907).

Em 1911 foram identificados inclusões intracitoplasmáticas em lactentes com uma forma não-gonocócica da oftalmia neonatal chamada conjuntivite de inclusão do recém-nascido (ICN), ao identificar mães de crianças afetadas, foram encontradas inclusões em suas células epiteliais cervicais, e os pais das respectivas crianças apresentavam inclusões em suas células uretrais, e com isso a epidemiologia das infecções sexualmente transmissíveis por CT foi revelada. Cinquenta anos depois, foram desenvolvidos procedimentos para o isolamento e conseqüentemente os estudos voltaram a demonstrar este patógeno como sendo a principal etiologia nas ISTs e na ICN (GRAYSTON, 1963).

Inicialmente foram consideradas como sendo vírus devido ao seu tamanho e parasitismo intracelular obrigatório, inclusive seu ciclo biológico foi descrito e designado como sendo um ciclo viral, porém em 1963 ao atentar para sua característica morfológica, foi classificado como organismos intermediários e que se assemelhavam a seres do reino monera (BELL *et al*, 1963; PAAVONEN, 1980).

#### 4.1.2 Epidemiologia

*Chlamydia trachomatis* é conhecida como a bactéria de transmissão sexual mais prevalente em todo o mundo, sendo por isso, considerada um grave problema de saúde pública (CDC, 2011).

A infecção por CT é a IST mais frequente no mundo, de acordo com o Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) em 2013 estudos recentes evidenciaram nos Estados Unidos um total de 1.401.906 infecções (CDC, 2014), verificando que a taxa de prevalência de 623 casos por 100.000 habitantes. De acordo com Scholes *et al* (2012) o aumento dos casos de CT foram maiores durante 2005-2007, este também foi o mesmo período de aumento da frequência no uso do teste de amplificação de ácidos nucleicos. Verificou-se também que

as taxas prevalência de doença inflamatória pélvica (DIP) diminuíram e as taxas de gravidez ectópica permaneceram inalterada (CDC, 2012).

Entre 1997 e 2007 as taxas anuais de prevalência de CT aumentaram de forma significativa para mulheres e homens. Isto pode ser devido ao melhoramento dos testes mais sensíveis, além de que o número de casos de infecções deste tipo é bastante variado entre populações variadas, já que os esquemas de controle se apresentam de forma diferenciada em muitos países, e muito dos casos que são relatados é devido estarem associados a outras patologias do trato reprodutivo (BENDER *et al*, 2011).

Em um estudo pioneiro e recente realizado na Europa em 2011, verificou-se que as infecções por CT representam a IST mais prevalente, de 1990 a 2009, quando comparadas a outras IST pesquisadas (Quadro 01) em vinte e três membros da União Europeia, e onde os dados ainda não estavam disponíveis e/ou não estavam relatados como nos países da Bulgária, República Checa, França, Alemanha, Itália, Liechtenstein e Portugal, onde 75% dos casos foram notificados em jovens entre 15 e 24 anos de idade, sendo a maior incidência em mulheres jovens (ECDC, 2011).

**Quadro 01:** Número total de casos notificados de *Chlamydia trachomatis*, gonorreia e sífilis nos países europeus em 1990-1999, 2000-2008 e 2009.

IST	Nº de casos		
	1990-1999	2000-2008	2009
<i>Chlamydia trachomatis</i>	722.586	2. 101.095	343.958
Gonorreia	406.753	318.233	29.202
Sífilis	126.438	192.917	18.279

**Fonte:** Adaptado de ECDC, (2011).

É importante perceber que o aumento do número de casos de infecções pode estar associado não apenas aos fatores de risco, mas com a melhoria da capacidade de diagnóstico, com a implementação de programas de rastreio e sistemas de vigilância em vários países, por outro lado, a diminuição do número de casos pode significar a real situação da epidemiologia de CT, no entanto há possibilidade de ser resultado de falha no diagnóstico (LOW *et al*, 2009; ECDC, 2011).

Na Austrália, em 1991 a infecção por CT genital tornou-se uma doença de notificação obrigatória, em todos os estados e territórios australianos exceto para New South Wales, que introduziu a notificação em 1997, esta estratégia proporcionou uma melhor estimativa da prevalência (NEWMAN *et al*, 2010).

De acordo com o estudo de meta-análise de Lewis *et al* (2012) que envolveu 76 trabalhos sobre a prevalência de infecções genitais por CT em populações australianas, a prevalência apresentou-se bastante variável, com taxas mais altas entre jovens menores de 25 anos em várias grupos populacionais, sendo mais prevalente entre mulheres não-indígenas e homossexual masculino, porém, entre os indígenas o maior número de casos foi restrita a homens heterossexuais. l.

Em um estudo multicêntrico, realizado em cinco países que envolveram 18.014 participantes, observou-se grande variação das taxas de mulheres assintomáticas infectadas por CT, sendo no Zimbaube (94,3%), Rússia (90,9%), China (86%), Peru (73,9%) e na Índia (31,2%) (DETELS *et al*, 2011).

Apesar de o Brasil ainda não apresentar programas sociais para o rastreo de infecções genitais por CT, os testes de diagnóstico baseados na amplificação de ácidos nucleicos têm mostrado uma prevalência destas infecções variando de 5,0% a 31% entre os jovens que frequentam ambulatórios e clínicas ginecológicas, além disso, verificou-se que no Brasil os genótipos E, F e D de CT são os mais prevalentes (LIMA *et al*, 2007; MACHADO *et al* (2011).

De acordo com Machado *et al* (2012) a prevalência de infecções genitais por CT em adolescentes foi de 31% no Estado da Bahia, sendo esta, a maior taxa já relatada no cenário nacional. Neste estudo não foi identificada associação da idade na primeira relação sexual, do número de parceiros sexuais e nem da frequência do uso do preservativo em adolescentes infectadas.

### **4.1.3 O agente etiológico**

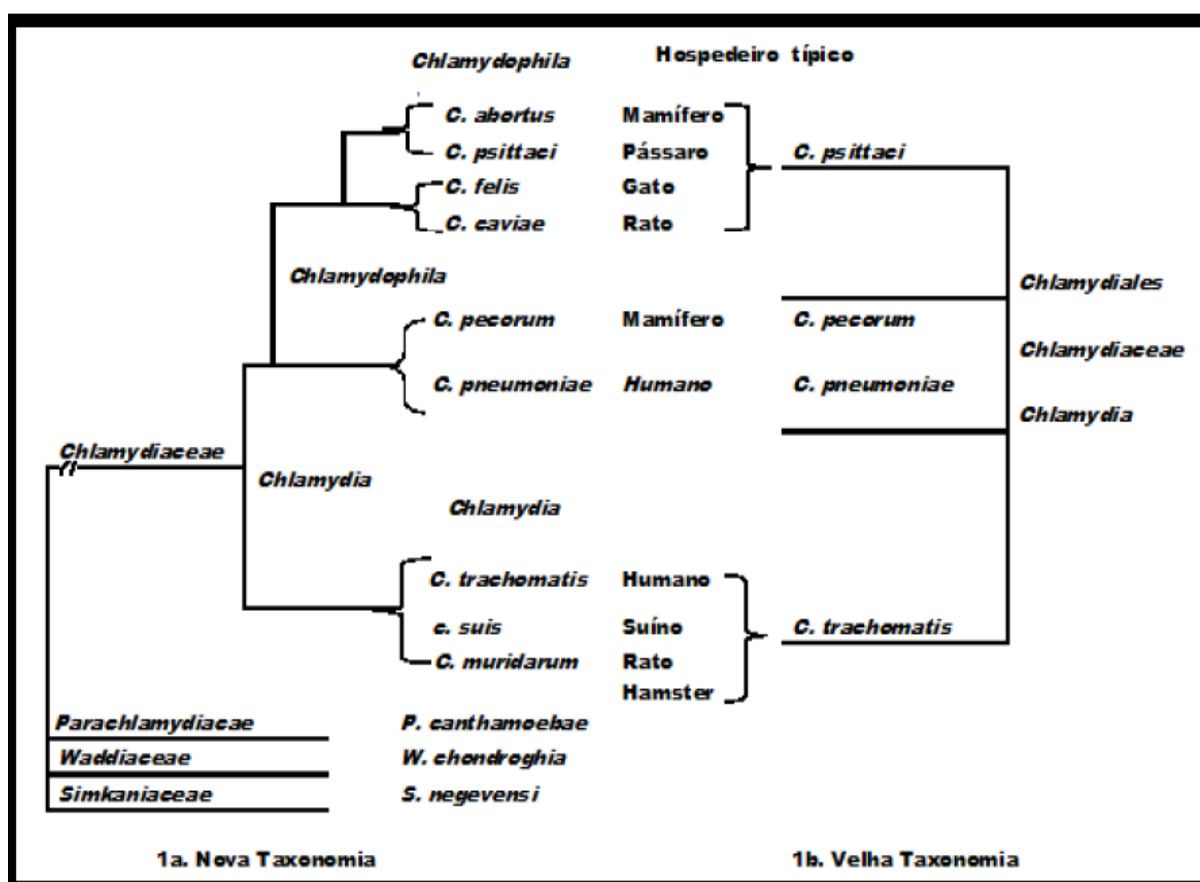
#### **4.1.3.1 Taxonomia de *Chlamydia trachomatis***

Ao longo da história, a taxonomia de *Chlamydia trachomatis* sempre foi sujeita a modificações. A partir de 1957 decidiu-se agrupa-la na ordem *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, onde se encontra o gênero *Chlamydia*, que comportava apenas duas espécies *Chlamydia psittaci*, agente etiológico apenas de infecções veterinárias e *Chlamydia trachomatis*, agente causador de infecções oculares e genitais em humanos (RAKE, 1957).

Esta classificação taxonômica não suportou a introdução de novas estirpes, já que os métodos moleculares evidenciaram o aumento da diversidade de CT, então, em 1999, foi proposta uma classificação baseada em critérios morfológicos e fenotípicos, como a presença de glicogênio e a sensibilidade a Sulfadiazima respectivamente, porém os critérios genéticos



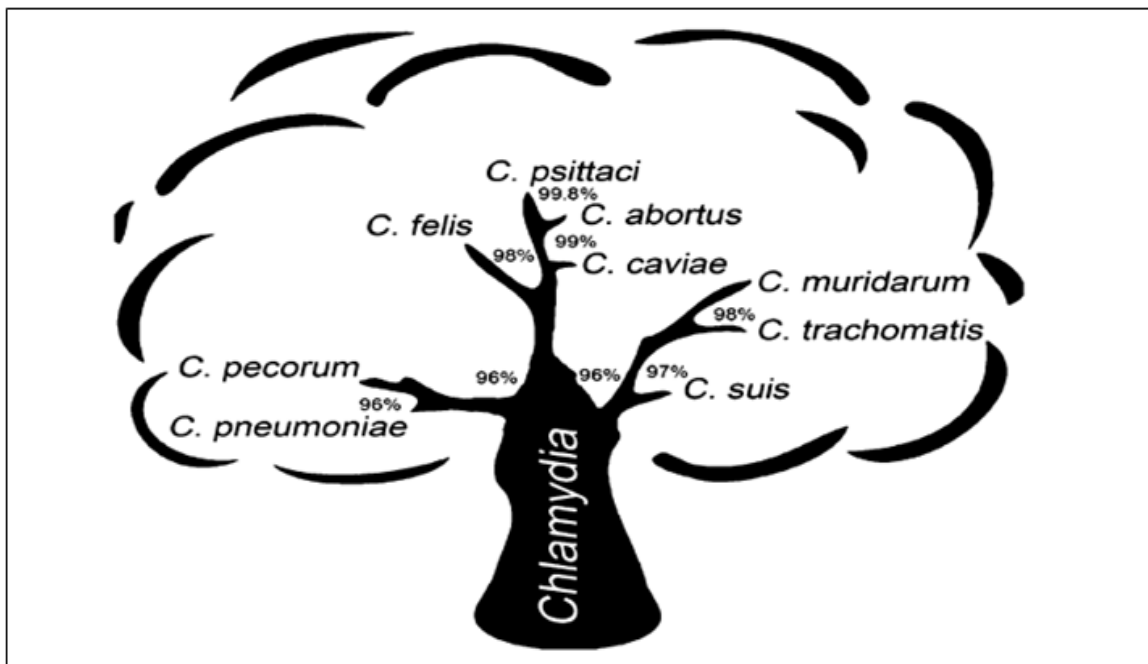
foram os principais na análise filogenética da sequência de RNA ribossômico (rRNA) 16s e 18s com um limiar arbitrário de similaridade maior de 95%, foram agrupadas quatro famílias *Sinkaniaceae* (*Sinkania negevensis*), *Waddliaceae* (*Waddlia chondrophila*), *Parachlamydiaceae* (*Parachlamydia acanthamoebae*) e *Chlamydiaceae*, na qual esta última apresenta dois gêneros, *Chlamydophila*, (espécies *Chlamydophila pneumoniae*, *Chlamydophila pecorum*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila felis*, *Chlamydophila psittaci* e *Chlamydophila caviae*) e *Chlamydia* com as espécies *Chlamydia suis*, *Chlamydia muridarum* e *Chlamydia trachomatis* (figura 01). Esta taxonomia não leva em consideração a biologia de outros organismos intracelulares (EVERETT *et al*, 1999; BAVOIL, 2013).



**Figura 01:** comparação entre a antiga e atual taxonomia de *Chlamydia trachomatis*.

Fonte: Everett *et al*, (1999).

De acordo com Stephens *et al* (2009), a classificação em dois gêneros da família *Chlamydiaceae* é incoerente, já que todas das espécies bacterianas analisadas não apresentam um limiar de similaridade menor que 95%, que é utilizado para especiação de família em dois gêneros, sugerindo um único gênero, o *Chlamydia* para todas as espécies (figura 02).



**Figura 02:** Árvore genealógica demonstrando o limiar de parentesco entre espécies do gênero *Chlamydia*.  
**Fonte:** Stephens *et al* (2009).

A classificação taxonômica proposta em 1999, que tem como base a análise das sequências ribossomais, não foi utilizada pela comunidade científica desde a sua introdução, devido não apresentar um marcador biológico consistente, pois apenas o 16s é abordado e não levam em consideração aspectos ecológicos das cepas, além do que há riscos de pouca alteração genética entre cepas que compartilham o mesmo nicho intravacuolar, isto pode ser observado nas produções atuais que ainda se referem à *Chlamydia pneumoniae* (STEPHENS *et al*, 2009).

Do gênero *Chlamydia*, as únicas capazes de contaminar seres humanos são as espécies: *Chlamydia psittaci* que causa a psitacose, transmitida por aves contaminadas, com um quadro respiratório com chances de evoluir para pneumonia grave e infecção sistêmica; *Chlamydia pneumoniae* que causa pneumonia grave com chances para evoluir para doença aterosclerótica e a CT que causa infecções oculares, respiratórias e genitais (SEHNEM *et al*, 2010; OLIVEIRA *et al*, 2008; REILLY *et al*, 2007).

#### 4.1.3.2 Aspectos morfofuncionais

A estrutura morfológica e funcional de CT é de aproximadamente 0,2 µm de diâmetro, mas podendo variar de tamanho dependendo do estágio morfológico em seu ciclo biológico, mas o que a caracteriza como bactéria é basicamente a composição de uma parede celular que é semelhante à parede de gram negativo, exceto por não haver quantidade suficiente de peptidoglicano no espaço periplasmático, e não apresentar proteínas ligáveis a penicilina

(PBP) ou ácido murâmico. A parede celular é trilaminar, sendo constituída por lipopolissacarídeos (LPS), proteína principal de membrana externa (MOMP) sua rigidez é conferida por proteínas contendo ligações dissulfeto-reticulados (SEADI *et al*, 2002; MPIGA & RAVAOARINORO, 2006).

O corpo celular tem a forma esférica, há a presença de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), um ribossomo que revela capacidade reduzida de produção de proteínas, e metabolismo enzimático diferenciado (glucose de produção e desintegração de gás carbônico). Tem apenas ciclo de vida intracelular, porém há a falta de alguns dos seus próprios mecanismos de produção de energia metabólica, importando a adenosina trifosfato (ATP) do citosol da célula do hospedeiro (parasitismo de energia) com adenosina difosfato (ADP), e com a enzima ATP/ADP translocase (BELLAND, 2003).

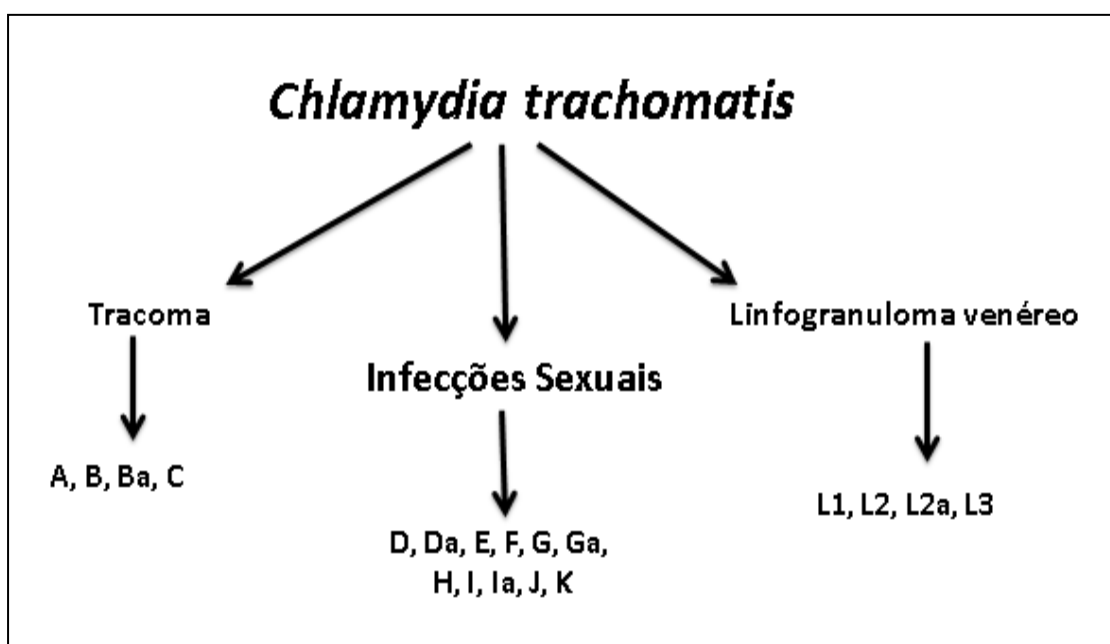
Observa-se a formação de inclusões citoplasmáticas (figura 04) e não crescem em meios de culturas bacterianos sintéticos. Apresentam a sensibilidade ao ambiente externo (temperatura, luz, secagem), resistindo por 15 minutos a 45°C, e apenas um minuto a 80°C. Apresentam sensibilidade aos desinfetantes comumente utilizados, como uma solução de 1% de cloramina (KARI *et al*, 2009; FISHER *et al*, 2013).

A MOMP é a proteína codificada pelo gene *omp1* e compreende aproximadamente 60% do peso molecular da membrana celular, a qual é essencial para a diferenciação sorológica de cepas de CT, bem como serve também de alvo para o desenvolvimento de vacinas (STEPHENS *et al*, 1987; CHENG *et al*, 2011). Byrne (2010) relata que não há estudos que comprovem que a variação das proteínas MOMP pode estar associada ao perfil de virulência da cepa.

A alta capacidade de CT infectar vários tipos celulares não fagocíticas se deve, principalmente, a capacidade das adesinas bacterianas reconhecerem receptores conservados da célula do hospedeiro, mas quanto a isso não existe consenso claro sobre a natureza das moléculas de adesina e dos receptores, no entanto pode-se incluir como possíveis fontes de interação com o hospedeiro as proteínas *momp1*, *MompB*, *Hsp70*, *Hsp60* e *Hsp10* (MASCELLINO *et al*, 2011; ABDEL-RAHMAN & BELLAND, 2005).

As estirpes patogênicas humanas estão divididas em 19 genótipos de acordo com as sequencias da região *omp1*, o perfil da infecção (figura 03), os que infectam primordialmente epitélios, mas podem ser subdivididos em dois subtipos na qual pode apresentar-se por diferentes manifestações clínicas, tracoma sendo representados por A, B, Ba e C que são transmitidos pelo contato direto, e são responsáveis por infecção no epitélio ocular

(ANDREASEN *et al*, 2008). As infecções urogenitais, conjuntivite em adultos e crianças e pneumonia em crianças são causadas pelos seguintes genovares D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J e K, já os tipos L1, L2, L2a, L3 causam o linfogranuloma venéreo uma infecção de caráter sistêmico e invasivo nos tecidos linfáticos, acompanhando de úlceras perigenitais e inflamação anal e retal que são relatados principalmente em homens que fazem sexo com homens (MABEY *et al*, 2001; MABEY *et al*, 2002; QUINT *et al*, 2011; CHOROSZY-KRÓL *et al*, 2012).



**Figura 03:** Genótipos da *Chlamydia trachomatis* classificadas de acordo com o perfil da infecção.

**Fonte:** Adaptado de Quint *et al*, (2011).

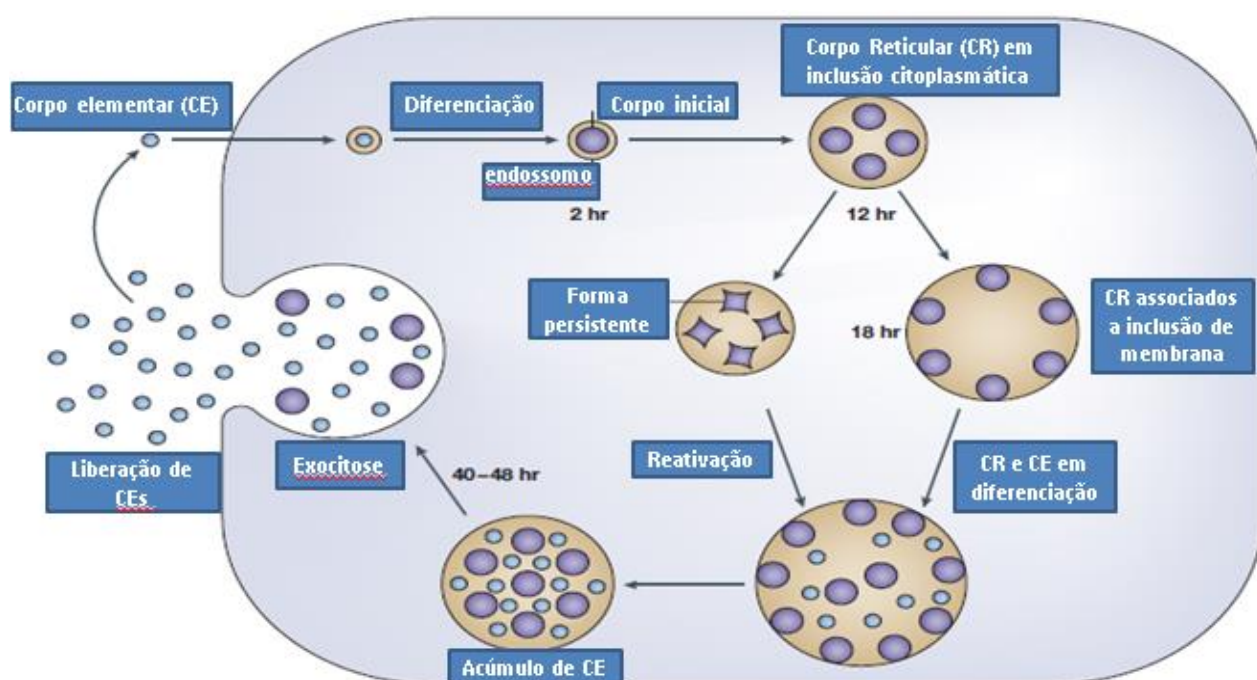
#### 4.1.3.3 Ciclo biológico

Todas as bactérias do gênero *Chlamydia* têm um desenvolvimento único e diferenciado, o ciclo bifásico, durante o qual a bactéria é encontrada em duas formas, a forma extracelular chamada corpos elementares (CE) e a forma intracelular que são os corpos reticulares (CR). São as proteínas dissulfeto-reticulados que conferem rigidez ao CE, que são soltas no momento em que se transforma em CR (STEPHENS *et al*, 2006).

O CE é osmoticamente estável e metabolicamente inativo, sendo infectantes para o homem. São estruturas em forma esférica, com membrana e parede celular capaz de lhe assegurar resistência temporária a determinados fatores ambientais, e que podem prejudicar sua homeostase. Possui um nucleóide compactado, devido à condensação de material nuclear pelas proteínas bacterianas histona-like hctA e hctB, e são de tamanho pequeno com aproximadamente 0,2-0,6 µm de diâmetro (HECZKO, 2007; CLARKE, 2011).

Uma vez internalizado, o CE altera as propriedades das inclusões citoplasmáticas do hospedeiro, dissociando-o dos lisossomos, e por meio de processos que requerem a participação ativa da CT, duas horas após a entrada em células hospedeiras, permanecem em estreita proximidade do complexo de Golgi, onde ocorrerá fusão das vesículas de acolhimento contendo esfingomiélnina. Tais processos são necessários para a replicação bem sucedida em uma célula hospedeira. Os mecanismos moleculares utilizados para controlar a biologia dos vacúolos ou inclusões intracitoplasmáticas são pouco conhecidos (ABDEL-RAHMAN & BELLAND, 2005).

No interior das inclusões citoplasmáticas o CE diferencia-se em CR após várias transformações. Ao contrário dos CE, CR são maiores com tamanho aproximado de 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, o nucleóide é menos compactado, suas proteínas dissulfeto-reticulados são perdidas, mas é metabolicamente ativo e capaz de se dividir por fissão binária no interior de vacúolos durante todo o ciclo de desenvolvimento, até se diferenciarem em novos CEs que serão expelidos pela lise celular (figura 04). Este ciclo ocorre em média de 48-72 horas após a infecção (WYRICK, 2000; BRUNHAM & REY-LADINO, 2005).



**Figura 04:** Ciclo biológico da *Chlamydia trachomatis*.  
**Fonte:** BRUNHAM & REY-LADINO, 2005.

Drauty-Varsat *et al* (2005) levantaram a hipótese de uma interação reversível inicial, seguida por uma ligação irreversível da CE à célula do hospedeiro por meio da ligação à superfície exposta da proteína MOMP, e para isso os proteoglicanos de heparan sulfato podem ser importante na interação inicial reversível do CE com a célula hospedeira (TIWARI *et al*, 2012; STEPHENS *et al*, 2001), no entanto, de acordo com Stephens *et al* (2006), apenas isto não se mostra suficiente para a interação e infecção natural de CT.

#### 4.1.3.4 Aspectos genômicos

*Chlamydia trachomatis* apresenta um dos menores e mais conservados genomas já identificados entre os micro-organismos, sendo constituído por um cromossomo único e circular composto por 1.042.519 pb, com 58% de peso de A-T. Apresenta uma região polimórfica denominada zona de plasticidade (ZP) que alberga genes altamente variáveis entre cepas. Nesta ZP são encontrados genes que estão envolvidos na produção de substâncias de caráter citotóxico onde se observa um operon intacto (*trpRBA*) capaz de codificar triptofano funcional, o qual é um fator de virulência e de exclusividade funcional, apenas dos genovares relacionados às infecções genitais. Este genoma codifica 875 proteínas, sendo 70 destas exclusivas de CT, além de apresentar o rRNA 23S, 16S e 5S (CARLSON *et al.*, 2008; SETH-SMITH *et al*, 2009; HARRIS *et al*, 2012).

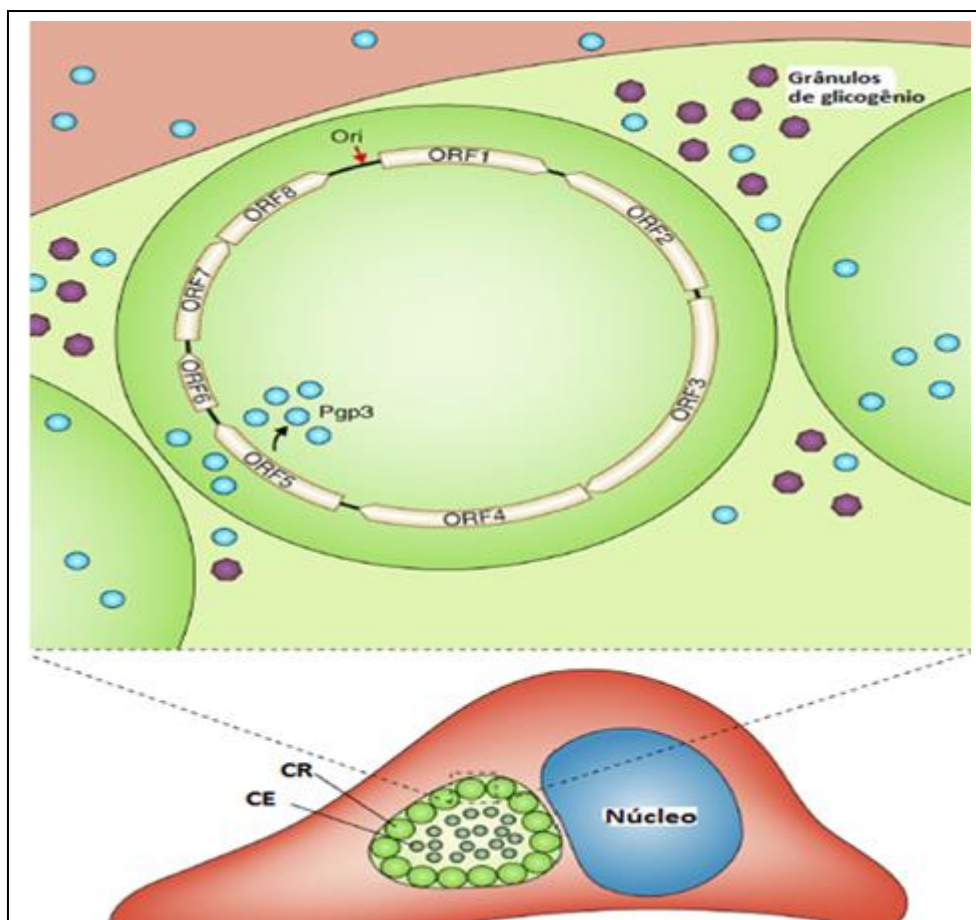
Já foi relatado que a recombinação é característica do genoma da CT, que pode ser o principal mecanismo para gerar a diversidade dentro de um conjunto de genes isolados. Isso pode surgir porque a infecção mista com diferentes cepas de CT em uma mesma pessoa ocorre com uma frequência de cerca de 1% (CLARK, 2011).

Apresenta um plasmídeo não-conjugativo e não-integrativo críptico de 7,5 kb, sugere-se ser um fator de virulência que pode estar associado à patogênese da infecção e à capacidade de colonização e sustentação da infecção no trato genital feminino, sendo fundamental na codificação de fatores que formam o peptidoglicano e o acúmulo de glicogênio na inclusão citoplasmática. Existem apenas quatro relatos de cepas isoladas que naturalmente não apresentam plasmídeo, as análises filogenéticas demonstram que o mesmo tem seguido a mesma evolução do seu cromossomo cognato, permanecendo intimamente ligados sem ocorrer troca de material genético como transposons ou de bacteriófagos ou mesmo restos de material genético de bactérias de vida livre, não sendo relatada a evolução independente do plasmídeo. Além disso, o plasmídeo é relativamente estável e mais resistente aos danos por enzimas degradativas como as nucleases, estando presente em até dez cópias por genoma (CARLSON *et al*, 2008; SETH-SMITH *et al*, 2009; CLARK, 2011; WANG *et al*, 2013).

De acordo com Li *et al* (2008), já foram identificados os plasmídeos pCTA, pCTT1, pCHL1, pLGV440, e pLGV2 por sequenciamento dos genótipos A, B, D, L1 e L2 de CT.

O plasmídeo codifica oito sequências de codificações previstas (SCDs) que podem ser denominadas de quadros de leitura aberta (ORFs). Com exceção de um, elas são arranjadas de forma que todos os genes são transcritos em sentido uniforme. Atribuição da função biológica dos oito genes do plasmídeo é difícil devido à ausência de um meio simples de cultivo para manipular o genoma da CT (ROCKEY, 2011).

As análises de bioinformática indicaram que as sequências de codificação pORF1-pORF3 estão provavelmente envolvidas na replicação do plasmídeo, visto que elas regulam a origem da replicação do plasmídeo e ambas as sequências são homologicamente semelhantes, e são também relacionadas a outras recombinases bacterianas e enzimas de replicação distantes. A pORF3 tem homologia com o gene *dnaB* de *Escherichia coli*, que codifica uma enzima envolvida no desenrolamento da fita de DNA durante a replicação. A pORF4 apresenta função desconhecida e a pORF5 codifica uma proteína de 28 kDa a *pgp3* uma molécula trimérica que é transportada para o citosol da célula hospedeira durante o processo infeccioso e sugere-se que esteja envolvida no reconhecimento por anticorpos humanos e de animais infectados por CT para induzir imunidade protetora. A pORF6 parece estar associada ao metabolismo do glicogênio; a pORF7 e pORF8 são homólogas e é provável que sejam essenciais para a manutenção do plasmídeo (figura 05)( LI *et al*, 2008; ROCKEY, 2011; WANG *et al*, 2013).



**Figura 05:** Formas morfológicas da *Chlamydia trachomatis* em vesícula de inclusão, corpo reticular (CR) e corpo elementar (CE), em destaque o plasmídeo com as oito ORFs, e o ORF5 que codifica *pgp3*.

**Fonte:** Adaptado de Rockey,(2011).

#### 4.1.3.5 Resposta imunológica

A imunidade do hospedeiro está diretamente ligada à sua susceptibilidade às infecções gerais, no caso das infecções genitais o mesmo micro-organismo pode causar diferentes respostas e conseqüentemente sintomas em diferentes indivíduos (WITKIN *et al*, 2000).

A imunopatogênese relacionada à infecção por CT ainda não está bem compreendida, mas se sabe que a forte resposta imune adaptativa é capaz de desenvolver e aumentar a virulência e piorar o curso clínico da doença que pode tanto proteger, quanto danificar o tecido (MOLANO *et al*, 2005).

A cura da infecção depende tanto de uma resposta imunológica normal, como de um tratamento com antimicrobiano, porém algumas mulheres não são capazes de eliminar o patógeno de forma adequada, e isto contribui para o surgimento de lesões crônicas em um processo inflamatório assintomático (MASCELLINO *et al*, 2011).



A imunidade inata é baseada em receptores que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) conservados e que são encontrados em certos microorganismos invasores, que são reconhecidos por receptores específicos das células imunitárias do hospedeiro. Entre estes, estão envolvidos principalmente os receptores da classe *Toll-likes* (TLKs) TLK1 e TLK2, encontrados em células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK) e os nucleotídeos de domínios de oligomerização (NODs). Ambos reconhecem e induzem a ativação do fator nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa$ B), e posteriormente, uma cascata de transdução de sinais promove o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, após a ligação ao DNA celular (WIRA, 2005; O'CONNELL *et al*, 2006; MASCELLINO *et al*, 2011).

Em células humanas, o receptor TLR2 é quem reconhece o peptidoglicano de CT como sendo um PAMP, e este é expresso principalmente nas tubas e colo do útero, já o receptor TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) sendo principalmente expresso no interior das tubas e do endométrio, e pouco na endocérvice (DEN HARTOG *et al*, 2006; HORNE, 2008). Os NODs (NOD1 e NOD2) são capazes de reconhecimento intercelular. As sequelas tardias, como a patologia tubária, aumentam com o número de variações genéticas de TLKs e NODs (DEN HARTOG *et al*, 2006).

Após a infecção inicial, são produzidos vários mediadores pró-inflamatórios como as citocinas CCL5, CXCL16, CXCL 10, CXCL1, IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-12, IL-6, fator estimulante de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF), e até oncogenes relacionados ao crescimento (GROA) que induzem e aumentam a resposta inflamatória celular estimulando os danos nos tecidos e expressão da molécula de adesão endotelial, no qual ajuda a atração de células imunes (DARVILLE & HILTKE, 2010).

O sistema imune inato produz outros mediadores importantes na resposta contra a infecção e/ou sequelas causadas por CT, como o NAP (Peptídeo Antimicrobiano Natural) que inclui o inibidor da secreção de proteinase por leucócito (SLPI) e o elafin que tem ação antiproteinase e antibacteriana e com isso contribui para a prevenção de danos teciduais contrastando com ação das metaloproteases produzidas por neutrófilos no processo inflamatório (GANZ, 2004). As defesas produzidas por leucócitos e células epiteliais foram relatadas em ambiente estéril uterino de grávidas (KLOTMAN & CHANG, 2006).

A resposta adaptativa que é estabelecida após uma sensibilização ocorrida primordialmente com o sistema inato, é observada que a imunidade celular inicia-se pela ativação das células apresentadoras de antígenos (APCs) com a produção de IL-12 e IFN-  $\gamma$ .

Esta poderá induzir a resposta Th1 que produzirá IL-12, IL-2 e IFN- $\gamma$ , a qual está associada à resolução da doença; ou a resposta Th2, que será ativada pela IL-4 e IL-10 que produzirá as citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, onde estão associadas ao aparecimento de sequelas tardias. Sendo a CT um patógeno intracelular, os corpos reticulares persistem e ambas as respostas imunológicas adaptativas podem contribuir para a imunopatogênese (BRUNHAM & REY-LADINO, 2005; AGRAWAL *et al*, 2009).

Na resposta humoral os linfócitos B são estimulados a produzir IgG e IgA, que são as imunoglobulinas mais prevalentes. A função é neutralizar ou destruir diretamente os patógenos na fase de corpos elementares, sendo a prevalência de anticorpos IgG é significativamente maior (52% a 72%) em mulheres que apresentam oclusão tubária bilateral (AGRAWAL, 2009; DARVILLE & HILTKE, 2010; BAUD *et al*, 2011).

#### 4.1.3.6 Genótipos

Os genótipos associados às infecções sexuais são D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J e K, porém os genótipos D, F, E, G mostram significativamente associados às mulheres com idade inferior a 25 anos, de alta exposição aos fatores dos riscos das ISTs (PIÑEIRO *et al*, 2009; PETROVAY *et al*, 2009; BENI *et al*, 2010; MACHADO *et al*, 2011; MEJUTO *et al*, 2013).

Os trabalhos que abordam a genotipagem das cepas de CT mostram-se em populações variadas, revelam alta taxa de infecções pelo genótipo E. Uma alta prevalência da 48,5% do genótipo E, seguida de F (42,4%) e J (31,8%) foi encontrada em crianças menores de seis meses de idade, internadas no departamento de pediatria e neonatologia de um hospital público na China, não sendo encontrada nenhuma associação aos fatores sintomatológicos (LI *et al*, 2015). Foi verificada alta taxa de 27,5% em infecções pelo genótipo E, seguida por G (25%) e D (12,5%) ao investigarem homens que fazem sexo com homens (MEJUTO *et al*, 2013). Em Taiwan, os genótipos E (27,7%) e J (27,3%) foram mais comumente encontrados em mulheres do que em homens heterossexuais (YANG *et al*, 2014). Para Beni e colaboradores, os mais prevalentes em infecções sexuais por CT foram os genótipos E (35,3%) e F (35,3%), seguida pela D/Da (23,5%) e K (5,9%), e não houve associação significativa entre genótipos e a presença de um marcador de inflamação crônica (BENI *et al*, 2012). Porém no México, a prevalência do genótipo F (54,2%) foi a maior já registrada, seguido pelo genótipo E (8,7%), L (8,7%), K (8,7%), sendo encontrado o genótipo L2 em mulheres inférteis, sem sinais ou sintomas de LGV (HARO-CRUZ *et al*, 2010).

#### 4.1.4 Manifestações clínicas e complicações

A infecção por CT pode acometer vários órgãos e tecidos, tais como o aparelho geniturinário, faringe, conjuntiva ocular, pulmões, fígado, articulações entre outros. A artrite reativa, o tracoma e a conjuntivite são manifestações comuns em ambos os sexos. Porém, observa-se que as infecções genitais são as mais comuns em pessoas sexualmente ativas (CDC, 2007; FLORES *et al*, 2011).

A manifestação clínica é bastante variável, pois cerca de 80% das mulheres com infecção cervical e 50% dos homens com uretrite são assintomáticos (BRUNHAM & REY-LADINO, 2005; GEISLER & STAHHM, 2011). Quando presentes, os sintomas podem se apresentar de forma discreta, podendo ser confundidas com outras etiologias sexualmente transmissíveis, porém, as queixas mais comuns são corrimento vaginal acompanhado ou não de ardor e prurido vulvar, que em geral ocorre no período pré-menstrual ou pós-coito, também é comum perceber os sintomas de sinusorragia e sangramento transvaginal intermitente devido à cervicite erosiva tornarem o epitélio cervical congesto e sensível podendo ser acompanhada de dispareunia e dor no abdome inferior. Além disso, 50% das mulheres que apresentam tal infecção podem apresentar infecção uretral concomitante (WILSON *et al*, 2002; GEISLER & STAMM, 2011).

De acordo com Cornetta *et al* (2006), o exame citológico mesmo com sensibilidade de 98%, ainda sim é preciso a confirmação dos testes específicos complementares, que é observado apenas nos programas de triagem para o diagnóstico da infecção.

Quando não diagnosticada ou não tratada, a infecção em mulheres pode tanto adquirir a cura espontânea quanto a persistência da infecção com progressão para as complicações tardias que ascendem o aparelho genital feminino, porém a incidência das complicações pode ser variada entre 1% a 30% das infecções do trato genital inferior (WESTROM *et al*, 1992; GEISLER *et al*, 2008; LAND *et al*, 2010).

As complicações mais temíveis que podem estar relacionadas à infecção cervical por CT é a doença inflamatória pélvica (DIP), que afeta diretamente a vida reprodutiva da mulher, pois pode ocasionar esterilidade definitiva, constituindo grave problema de saúde pública, por ser a maior causa de infertilidade evitável já registrada no mundo (GEISLER & STAMM, 2011; MANIA-PRAMANIK *et al*, 2012).

O exame histológico de tecidos a partir de mulheres com DIP causadas por *Chlamydia trachomatis* revela neutrófilos na superfície endometrial e dentro do lúmen da glândula, e infiltração subepitelial, nos centros germinais há a presença de linfócitos transformados.

Embora uma revisão mostrou que a taxa de progressão de ambos (DIP e sequelas reprodutivas) entre as mulheres que adquirem infecção sexual por CT ainda é incerto, sugere-se mais estudos que comprovem a história natural deste patógeno (KIVIAT *et al.*, 1990; STEPHENS, 2003; HAGERTTY *et al.*, 2010).

A associação de infecções por CT e aborto espontâneo ainda não está totalmente claro, em estudos anteriores não conseguiram documentar tal associação, provavelmente, por causa do número limitado de pacientes em alguns deles, resultantes da baixa prevalência de infecção sintomáticas e/ou menor sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados, mas há vários estudos que associam a alta prevalência de anticorpos contra CT com abortos espontâneos e recorrentes (BAUD *et al.*, 2008; BAUD *et al.*, 2011).

A doença inflamatória pélvica (DIP) ocorre devido à ascensão da infecção por CT ao trato genital feminino, é caracterizada por um espectro de distúrbios inflamatórios, como salpingite, dor pélvica crônica, inflamação no útero, tubas uterinas, abscesso ovariano e fator de infertilidade tubária pelos danos aos cílios que revestem as tubas, com a formação de aderências entre órgãos pélvicos, podendo causar peritonite pélvica. Apesar desta condição clínica poder ser de outra etiologia, a infecção por CT é um importante fator de risco para a evolução para DIP (PAAVONEN *et al.*, 2008; CDC, 2009; HAGGERTY *et al.*, 2010). O primeiro a estimar a incidência de DIP após a infecção não tratada, em vinte mulheres co-infectados com CT e *Neisseria gonorrhoeae*. Estas mulheres receberam terapia adequada apenas para a infecção gonocócica e foram acompanhados durante sete semanas, 30% recebeu o diagnóstico de DIP de médicos que não conheciam os resultados da cultura de CT dos pacientes (STAMM *et al.*, 1984; HAGGERTY, *et al.* 2010). Entre os danos da DIP a gravidez ectópica está entre os mais agressivos, pois é uma das maiores causas de morte materna (APROBATO, 2010; BENDER *et al.*, 2011).

#### **4.1.5 Transmissão**

A transmissão dos genótipos sexuais de CT, mais precisamente os D à K e os do grupo L, está associada diretamente à transmissão sexual e podem comprometer primordialmente o epitélio colunar onde ocorreu a via de transmissão. Os genótipos de D à K desenvolvem uma patologia local, já os tipos do grupo L a doença adquire caráter sistêmico que poderá desenvolver o linfogranuloma venéreo, a partir disto as infecções por CT deste tipo também são consideradas como IST (MABEY & PEELING, 2002; MARKLE *et al.*, 2013).

#### 4.1.6 Fatores de risco

Os fatores de riscos associados às infecções sexuais por CT são os mesmo para as outras doenças sexualmente transmissíveis, como o início precoce da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros sexuais nos últimos 90 dias, ser solteira, falta de uso de preservativo nas relações sexuais, uso de contraceptivos hormonais orais por mulheres jovens, nuliparidade, presença de ectopia cervical, uso de ducha vaginal, pessoas privadas de liberdade, hábito de fumar, contato prévio de outra doença sexualmente transmissível e falta de conhecimento sobre as DST/Aids (SCHOLES *et al*, 1996; OMS, 2007; MARKLE *et al*, 2013).

#### 4.1.7 Diagnóstico

A *Chlamydia trachomatis* é um patógeno intracelular obrigatório, por isso, a coleta do material deve objetivar principalmente as células do hospedeiro que a abriguem. Para amostras de tecidos cervicais, onde a presença da bactéria pode ser rara, a amplificação de ácidos nucleicos se torna a melhor ferramenta diagnóstica. Trata-se de bactérias relativamente lábeis e a viabilidade delas podem ser garantidas refrigerando as amostras clínicas e minimizando o tempo entre a coleta e os procedimentos laboratoriais. O cultivo celular é indicado apenas para as amostras clínicas da endocérvice, uretra anterior masculina e conjuntiva ocular. Quando há ocorrência de corrimento e secreções abundantes, estes devem ser retirados antes do momento da coleta, a fim de eliminar inibidores e/ou elementos contaminantes. As amostras clínicas devem ser transportadas em meios específicos e independentes da metodologia adotada, a qualidade da amostra clínica coletada é fator determinante para o sucesso do teste (BRASIL, 1997(a); BRASIL, 2001; CDC, 2002).

##### 4.1.7.1 Cultura bacteriológica

A cultura bacteriológica permaneceu como “padrão-ouro” por muito tempo para o diagnóstico de CT, porém com a introdução de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos este método foi repensado para o uso devido as variações no desempenho de cultivo e outras limitações, as linhagens de células mais comumente utilizadas são McCoy, *buffalo green monkey kidney cells* (BGMK) e HeLa 299, a visualização é por imunofluorescência onde são utilizados conjugados de fluoresceína com anticorpos monoclonais para este fim. A coloração e observação das inclusões citoplasmáticas são por iodo ou Giemsa, onde de 42 a 72 horas de incubação a temperatura de 37° C já podem ser visualizadas (NEWHALL *et al*, 1999; WARFORD, 1999; CDC, 2002; ZIGANGIROVA, *et al*, 2013).

As vantagens da cultura celular são a especificidade de 100%, a visualização das inclusões de CT no espaço intracelular e a possibilidade de estocagem das cepas para o monitoramento de resistência aos antimicrobianos, como a determinada concentração inibitória mínima. As limitações do método de cultivo celular são a sensibilidade que varia em torno de 56,1%, a necessidade de infraestrutura laboratorial compatível, a dificuldade em avaliar a qualidade da amostra e o cuidado especial para transporte e acondicionamento da mesma (UR-REHMAN *et al*, 2012; SANDOZ *et al*, 2012).

#### 4.1.7.2 Testes imunoenzimáticos

O teste imunoenzimático como o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) permite a pesquisa sorológica de CT em grande número de amostras por investigar etiologia do aborto, infertilidade, doença inflamatória pélvica e gravidez ectópica. Apesar de menor especificidade que a cultura celular e a biologia molecular, as vantagens são a sensibilidade de 62% a 75%, a facilidade no transporte e acondicionamento da amostra e a objetividade na leitura dos resultados. Suas limitações são a especificidade de 80% a 95%, a impossibilidade de controle de qualidade da amostra e a necessidade absoluta de teste confirmatório, uma vez que já foram relatadas reações cruzadas (BRASIL, 1997 (b); WARFORD, 1999; BAUD, *et al* 2013).

A pesquisa sorológica não é recomendada para o diagnóstico de infecções urogenitais por causa da frequência de exposição aos genótipos da CT e pela ocorrência de reações cruzadas com outras espécies, especialmente a *Chlamydia pneumoniae*, este fato dificulta, portanto as determinações de anticorpo em uma única amostra (GRAYSTON, 1992; CDC, 2014).

#### 4.1.7.3 Imunofluorescência direta

A imunofluorescência Direta (IFD) é um método muito utilizado nos laboratórios de rotina, onde se detecta anticorpos contra antígenos específicos de CT em 40 minutos. É importante pela sua sensibilidade de 73,6% e especificidade que se mostra acima de 95%, a infra-estrutura laboratorial é simples para a execução, é de fácil transporte e acondicionamento das amostras, há possibilidade de avaliar a qualidade da amostra e pode ser teste confirmatório para o ELISA de triagem. A limitação deste método é a necessidade de profissional qualificado para sua execução (BRASIL, 1997). Van Dommelen *et al* (2010) demonstraram que a sensibilidade de IFD foi extremamente baixa de 7,1% a 25% em

comparação com testes de amplificação de ácidos nucleicos (BRASIL, 1997(b); SEADI *et al*, 2002; HARKINS & ERIKMUNSON, 2011).

#### 4.1.7.4 Imunofluorescência indireta

Na imunofluorescência Indireta (IFI) é detectada a cicatriz sorológica revelada através do soro do paciente, que é colocado em uma lâmina contendo substrato de CT onde será considerado positivo quando houver ligação de anticorpos anti-LPS, revelado com uma globulina anti-humana marcada com conjugado de fluoresceína. Este teste é do tipo gênero-específico, e é bastante utilizado em laboratórios, por ser rápido e suficientemente importante para o diagnóstico da infecção. Sua sensibilidade é em torno de 71% e especificidade é de 99,5% (SEADI *et al* 2002). Ao apresentar o anticorpo IgM e/ou IgA e um aumento significativo de pelo menos dois títulos de IgG no teste entre uma amostra colhida na fase aguda e outra na convalescente se evidencia uma infecção recente (WARFORD, 1999).

A microimunofluorescência (MIF) apresenta o mesmo princípio da IFI, porém difere quanto aos antígenos, que são utilizados em quantidades mínimas, e representam todas as espécies e genótipos de CT, este teste é indicado para a pesquisa de IgM no diagnóstico de pneumonia clamidiana em recém-nascidos, representa o teste sorológico mais sensível, porém esta técnica é laboriosa e de alto custo (WANG & GRAYSTON, 1974).

#### 4.1.7.5 Técnicas moleculares

As técnicas moleculares, como o teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) foram bem aceitos, devido principalmente às deficiências dos métodos tradicionais de diagnóstico laboratorial de CT. Com isso, no final da década de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecções clamidianas, por ser mais rápida e sensível e por não depender da viabilidade da amostra, já que a infecção adquire caráter assintomático que dificulta o diagnóstico, e tem como alvo as sequências de genes da proteína MOMP, do plasmídeo críptico ou do rRNA 16S do respectivo patógeno (SEADI *et al*, 2002; POIARES *et al*, 2008).

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos são extremamente sensíveis, capazes de detectar especificamente apenas uma cópia do gene, apesar de alguns inibidores de reações que podem estar presentes nas amostras clínicas. Estas técnicas são classificadas de acordo com sua estratégia utilizada para a detecção, que pode ser amplificação do sinal, do DNA alvo ou de sondas dirigidas ao DNA, reproduzindo milhões de cópias. A Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) é o método base para a amplificação de sequências de DNA,

sua sensibilidade é em torno de 80% a 97 % e sua especificidade é entre 91% a 99 % (GAYDOS *et al*, 2010; MOLLER *et al*, 2010), embora em um estudo realizado por ÖZÜBERK *et al* (2013), a PCR apresentou 100% de especificidade e sensibilidade.

Desde 2013 estão disponíveis no mercado cinco ensaios de NAAT que são Abbott RealTime m2000 CT / NG (Abbott Molecular Inc. Des Teste Plaines, Illinois), Amplicor e cobas CT/NG (Roche Diagnóstico Molecular, Branchburg, New Jersey ); Aptima, (Hologic / Gen-Probe, San Diego, Califórnia); BD ProbeTec ET e Qx (Becton Dickinson, Faísca, Maryland), e Xpert CT/NG Ensaio (Cepheid, Sunnyvale, Califórnia) (CDC, 2014).

A sonda que é mais utilizada como ferramenta para o diagnóstico é o PACE-2 (Gen-Probe, San Diego, Calif.) que consiste em utilizar uma sonda de DNA quimioluminescente que hibridiza com uma sequência espécie-específica do gene que codifica rRNA 16S, uma vez que a bactéria no estágio morfológico ativo apresenta mais de 100 cópias de rRNA 16S, o teste PACE-2 tem sensibilidade superior aos de detecção de antígenos. Em um estudo desenvolvido por Robuffo *et al* (2008) os autores constataram que mesmo que o Amplicor e Cobas (Sistemas Roche Molecular) seja considerado uma ferramenta mais promissora para o diagnóstico de rotina da infecção por CT, o Aptima permitiu identificar melhor CT em 4,8 % das amostras uretrais, em comparação com a amostra de urina. Isto leva a hipótese de que as formas de CEs poderiam estar ausentes na urina em infecção persistente. Apesar disto, nas mulheres que participaram do estudo, os esfregaços endocervicais eram semelhantes na faixa de detecção quando se compararam os dois métodos utilizados (MUSHANSKI *et al*, 2012).

Há os testes de detecção rápida de esfregaço vaginal, conhecida como testes point-of-care (POC) no qual muitas empresas utilizam como método mais rápido e de baixo custo comparados aos testes de amplificação de ácidos nucleicos, mas seu uso na clínica ainda é alvo de debates e discussões, sendo aconselhado em ambientes onde os pacientes não retornem confiavelmente (HUANG *et al*, 2013). Van Dommelen *et al* (2010) demonstraram que a sensibilidade de Ct-POC está em torno de 12%, desconsiderando seu uso por implicações na prática clínica, reforçando a necessidade de garantia da sua qualidade (DEAN *et al*, 2012).

#### **4.1.8 Tratamento**

As bactérias do gênero *Chlamydia* são susceptíveis aos antimicrobianos que interferem na síntese de DNA e de proteínas, como as tetraciclínas, os macrolídios e quinolonas, essas estratégias terapêuticas têm sido mais amplamente estudadas e utilizadas no tratamento de infecção humana (HAMMERSCHLAG & KOHLHOFF, 2012). O tratamento pode evitar a



transmissão sexual e/ou reinfecção do paciente, no qual deve ser fornecida imediatamente para todas as pessoas com teste positivo para a infecção. O regime terapêutico aconselhado para infecções genitais causadas por CT é a administração de dose única de azitromicina (1g) ou doxicilina (100mg) duas vezes ao dia durante sete dias. Outra estratégia terapêutica pode ser a eritromicina etilsuccinato (800mg) ou eritromicina (500mg) quatro vezes ao dia durante sete dias. Apesar de apresentar uma eficácia menor, também pode ser utilizado as quinolonas como ofloxacina (300mg) com duas doses orais ou uma dose oral de levofloxacina (500mg) ambas durante sete dias. Os pacientes infectados devem ser aconselhados à abstinência sexual por até sete dias após o término do tratamento com dose única (CDC-MMWR, 2010; CDC-MMWR, 2011).

Relatou-se uma região de mutação do genoma de CT que determinava o fenótipo de resistência desta aos macrolídeos, que possivelmente foi selecionada por pressão seletiva exercida com o uso contínuo das estratégias terapêuticas com macrolídeos e tetraciclina (BHENGRAJ *et al.*, 2011; UR-REHMAN *et al.*, 2012).

#### **4.1.9 Controle**

A avaliação dos conhecimentos e atitudes sobre as IST é fundamental para a intervenção com medidas de prevenção em uma população, principalmente se esta for caracterizada por indivíduos jovens e que estão em maior exposição aos fatores de riscos. Como a infecção por CT evolui em caráter predominantemente assintomático, as medidas de rastreamento por biologia molecular associada à intervenção em educação em saúde, bem como o uso do preservativo no ato sexual, que ainda é a medida mais segura de prevenção às IST, sendo importantes no controle da doença (PINTO *et al.*, 2011; TRAVASSOS *et al.*, 2012; FERNÁNDEZ-BENÍTEZ *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado em 2004 pela *American Social Health Association* (ASHA), envolvendo 1.115 adultos, na faixa etária entre 18 e 35 anos, observou-se que 45% das pessoas solteiras não fazem uso de preservativos sexuais, 93% das pessoas acreditam que seus parceiros sexuais atuais não apresentam nenhuma IST, um terço dos participantes do estudo admitiu conversar com os seus parceiros a respeito de IST e menos da metade deles conversam sobre as mesmas com os seus médicos durante a consulta (CDC, 2009). Os programas de controle de infecções por CT devem ser baseados principalmente na triagem de infecção assintomática, que podem ser prevalente em mulheres jovens sexualmente ativas, dando ênfase na identificação e prevenção das lesões crônicas recorrentes (GOTTLIEB *et al.*, 2010).

## **5 METODOLOGIA**

### **5.1 TIPO DE ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA**

Foi realizado um estudo transversal, observacional e analítico para descrever os fatores de risco que podem estar associados à infecção genital por genótipos de CT em 438 mulheres estudantes de uma Universidade pública do Estado do Pará, que se certificaram do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram recrutadas espontaneamente para realização do exame preventivo do câncer do colo uterino (PCCU) no laboratório de citopatologia da UFPA durante o período de Janeiro de 2010 á Outubro de 2014.

### **5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Os critérios de inclusão foram mulheres que se certificaram do termo de consentimento livre e esclarecido para participação neste estudo. Independente de faixa etária, vida sexual ativa e que nunca realizaram exame preventivo Papanicolau ou que não tenham realizado há mais de 1 (um) ano, assintomáticas ou sintomáticas. Mulheres com idade inferior a 18 anos, só foram incluídas quando seguiram os parâmetros acima e obtiveram a permissão dos pais ou responsáveis para a realização do exame.

### **5.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Mulheres que estivessem menstruadas, mulheres grávidas, mulheres que não desejaram participar do projeto.

### **5.4 ETAPAS DO ESTUDO**

#### **5.4.1 Coleta do material**

Foi realizada a coleta da secreção cervical, que consiste na introdução do espécuro (sem lubrificante) no canal vaginal em mulheres nas seguintes condições: não menstruadas, três dias de abstinência sexual e sem utilizar duchas e cremes vaginais na véspera do exame. A escova citológica foi introduzida no canal cervical e girada em 360 graus, evitando-se contato com a parede vaginal, e em seguida foi colocada em uma lâmina identificada. Após esta etapa as lâminas foram fixadas em álcool 95%, coradas pela técnica de Papanicolaou e analisadas ao microscópio. Outra parte da amostra foi colocada em *eppendorf* para realização dos testes moleculares, e armazenadas em conservante Tris- EDTA.

#### 5.4.2 Protocolo de extração de DNA genômico

Do material clínico de secreção cervical, foi retirada uma alíquota de 300 µl (microlitros) e transferido para outro microtubo estéril de 1,5 ml. O DNA bacteriano foi extraído das células contidas no material cervical pelo método do fenol-clorofórmio, utilizando a metodologia descrita por ISOLA *et al* (1994). A esta alíquota de 300 µl, foi acrescentado 300 µl de tampão de lise de células (NaCl 1M; TRIS-HCl pH 8,0 1M; EDTA 0,5 M pH 8,0; SDS 10%) estéril e proteinase k na concentração final de 10 µg/ml. Os microtubos foram mantidos em banho Maria a 45°C durante uma hora e meia para ocorrer à completa dissolução do precipitado de células. Foi adicionado 300 µl de fenol tamponado pH=8 e de fenol/clorofórmio-Alcool Isoamílico (24:1) e homogeneizados por inversão durante 10 minutos e posteriormente centrifugados a 5.000 rpm durante 10 minutos. Em seguida foram retirados 600 µl do sobrenadante e transferido para novo tubo estéril de 1,5 ml. A este sobrenadante foram adicionados 600 µl de fenol/clorofórmio-Alcool isoamílico, posteriormente homogeneizados por 10 minutos e centrifugado a 5.000 rpm durante 10 minutos. Uma alíquota de 500 µl foi retirada do sobrenadante e transferida para tubo estéril de 2,0 ml. Neste tubo, foram adicionados 1.000 µl de álcool absoluto e 50 µl de acetato de sódio e homogeneizado gentilmente por inversão. Após homogeneização, este microtúbos foram centrifugados por 14.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Posteriormente, foram adicionados 500 µl de álcool a 75% gelado, seguido de agitação por 10 segundos. Os microtúbos foram centrifugados a 15.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Esta etapa foi realizada três vezes, a fim de eliminar restos de impurezas e reagentes das etapas anteriores da extração de DNA. Após esta etapa, os microtubos foram estocados a 45° C por 30 minutos na estufa e as amostras reidratadas com TRIS-EDTA (Tris- HCl 10 mM, pH=8; EDTA 1 mM).

#### 5.4.3 Protocolo de Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR)

##### 5.4.3.1 Amplificação do gene da β-globina humana

Posterior a extração do DNA genômico, foi realizada a amplificação do material extraído para o gene da β-globina humana utilizando os *primers* G73 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3') (GREER *et al.*, 1991), numa concentração de 5 pmol/µL (picomoles por microlitro). A amplificação foi realizada no termociclador da Biocycler MJ96G. Para esta reação foi utilizado 3,5µL de Go Taq® Green Master Mix, 2,0µL de água, 0,25µL dos *primers* G73/ 74

(cada) e 1µL do DNA molde , para um volume final de 7µL, onde foi multiplicado pelo número amostral. Foi incluindo um controle positivo, a fim de verificar a eficiência da reação, e um controle negativo contendo somente os reagentes de PCR e água, usados para monitorar a contaminação da reação. O produto das reações foram submetidas em corrida horizontal (100V/ 1Hora) em gel de agarose a 1% submerso em TAE 1X (Trisbase 1,6 M, Acetato de Sódio 0,8 M, EDTA- Na<sub>2</sub> 40mmM/ 1L de água deionizada) (TRIS-HCL 10Mm, pH=8; EDTA 1mM; Acetato), corado com brometo de etídio (0,5mg/mL), visualizadas sob luz ultravioleta (UV).

#### 5.4.3.2 Detecção do gene *omp1* de *Chlamydia trachomatis*.

Este consiste na amplificação do gene da região *omp1* da CT (JALAL *et al*, 2007) e foi realizada apenas nas amostras que apresentaram positividade para o gene da β-globina humana. Para a primeira reação da *Seminested-PCR* foi utilizado 6,0µL de Go Taq® Green Master Mix, 0,5 µL dos *primer* C.T P3/ P4 (cada) numa concentração de 10 pmol/µL e 2µL, DNA genômico e 3 µL de água estéril, para um volume final de 12µL. Posteriormente, na segunda reação, foi utilizado 6,0 µL de Go Taq® Green Master Mix, 4,5 µL de água estéril, 0,5 µL dos *primers* CT P6/ P4 (cada) numa concentração de 10 pmol/µL e 0,5 µL do produto da primeira reação, para um volume final de 12µL. Os *primers* apresentam as seguintes sequências (Quadro 02):

**Quadro 02:** Sequência de *primers* utilizados para a detecção do fragmento de 224 pb do gene *omp1* da *Chlamydia trachomatis*.

<i>Primers</i>	Sequência	Localização
P3/OMP	5'-AAACWGATGTGAATAAAGARTT-3'	OMP 224
P4/OMP (reverse)	5'-TCCCASARAGCTGCDCGAGC-3'	OMP 617
P6/OMP	5'- TGGGATCGYTTTGATGTATTYTGT-3'	OMP 394

**Fonte:** adaptado de Jalal *et al* (2007).

Para as duas reações da *Seminested-PCR*, seguiu-se o seguinte protocolo: desnaturação a 94°C por 4 minutos; seguida de 35 ciclos (repetições), onde a temperatura de desnaturação foi de 94°C por 40 segundos, de hibridização à 54°C durante 30 segundos, temperatura de ativação da *Taq* DNA Polimerase e extensão à 72°C por 1 minuto, seguida de temperatura de extensão de 72°C por 10 minutos, e por fim, resfriamento a 10°C por 3 minutos.

#### 5.4.3.3 Amplificação do fragmento de *omp1* de *Chlamydia trachomatis* para sequenciamento.

A *Nested-PCR* foi realizada para a amplificação de um fragmento maior do gene da região *omp1* de 1.102 pb da CT para o sequenciamento nucleotídico. Na primeira reação foi utilizado 0,5 µL dos *primers* P1 numa concentração de 10 pmol/µL, 0,5 µL do *primer* OMP2, numa concentração de 10 pmol/µL, 5,0µL de DNA genômico, 14 µL de água estéril, 2,5 µL de *buffer*(10x), 1,0 µL de DNTP(10mM), 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de Hotstar *Taq* DNA Polimerase 1.5U, para um volume final de 25µL. Em seguida, na segunda reação da *Nested-PCR*, utilizou-se 0,5 µL do *primer* MOMP87 e RVS 1059 em uma concentração de 10 pmol/µL, 1,5µL de DNA amplificado, 17,5 µL de água estéril, 2,5 µL de *buffer* (10x), 1,0 µL de DNTP(10mM), 1,0 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µL de Hotstar *Taq* DNA Polimerase, para um volume final de 25µL, que amplificou um fragmento de 990 pb. Os *primers* apresentam as seguintes sequências (Quadro 03):

**Quadro 03:** Sequência de *primers* utilizados para amplificação de 990 pb do gene *omp1* da *Chlamydia trachomatis* para sequenciamento.

<b>Primers</b>	<b>Sequência</b>	<b>Localização</b>
P1 ( <i>forward</i> )	5'-ATG AAA AAA CTC TTG AAA TCG G-3'	OMP1
OMP2( <i>reverse</i> )	5'-ACT GTA ACT GCG TAT TTG TCT G-3'	OMP1103
MOMP87( <i>forward</i> )	5'- TGA ACC AAG CCT TAT GAT CGA CGG A-3'	OMP87
RVS1059( <i>rverse</i> )	5'GCA ATA CCG CAA GAT TTT CTA GAT TTC ATC-3'	OMP1059

**Fonte:** adaptado de Lysén *et al* (2004).

Para a primeira reação da *Nested-PCR*, seguiu-se o seguinte protocolo: desnaturação a 94°C por 15 minutos; seguida de 35 ciclos (repetições), onde a temperatura de desnaturação foi de 94°C por 30 segundos, de hibridização à 55°C durante 30 segundos, temperatura de ativação da Hotstar *Taq* DNA Polimerase e extensão à 72°C por 90 segundos, seguida de temperatura de extensão de 72°C por 7 minutos, e por fim, resfriamento a 10°C por 3 minutos. No segundo *round* da *Nested-PCR*, as condições mantiveram-se semelhantes a do primeiro *round*, exceto a temperatura de hibridização que foi de 60°C.

#### 5.4.3.4 Eletroforese

Tanto para os produtos da *Nested*-PCR, quanto para os produtos da *Seminested*-PCR utilizou-se 5  $\mu$ L que foram visualizados por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio em TAE 1x (Trisbase 1,6 M, Acetato de Sódio 0,8 M, EDTA- $\text{Na}_2$  40mmM/ 1L de água deionizada) nas condições de 50 volts a 100 Ampéres por aproximadamente 1 hora. Foi aplicado 4  $\mu$ L do peso molecular, de 100 pb (Invitrogen) e amostras de controle positivo e negativo para cada corrida de eletroforese. Os fragmentos identificados foram visualizadas pelo sistema de fotodocumentação em géis, em câmara escura com transluminador (Vilber Loumat) duplo de 312 nm e luz ultravioleta.

#### 5.4.3.5 Purificação dos produtos da *Nested*-PCR

Os produtos de PCR que amplificaram para *C. trachomatis* foram submetidos a purificação pelo *kit HiYield Gel/PCR DNA Mini kit* (Cat. Nº YDF 100) - RBC *Real genomics*®. Brevemente, foi transferido 20  $\mu$ L do produto de PCR para um microtubo de 1,5 mL e adicionado 5x o volume de tampão (150  $\mu$ L), a mistura foi agitada em *vortex* por 1 minuto, transferida para a coluna encaixada no microtubo de 1,5 mL e centrifugada a 13.000 rpm por 30 segundos. Descartado o filtrado, a coluna novamente foi lavada com 120  $\mu$ L de tampão de lavagem, por 1 minuto, adicionado no centro da coluna, centrifugada a 13.000 rpm por 30 segundos, seguido de descarte do filtrado e transferência da coluna para outro microtubo (de coleta com nova centrifugação a 13.000 rpm por 3 minutos). Após esta etapa a coluna foi colocada em novo tubo, eluída com 20  $\mu$ L de tampão de eluição por 2 minutos, finalizando com centrifugação a 14.000 rpm por 2 minutos. O produto foi armazenado a -20°C até seu uso até a reação de sequenciamento.

#### 5.4.3.6 Reação de Sequenciamento

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados utilizando o *kit Big Dye (Terminator v 3.1 Cycle Terminator- Applied Biosystems)*, de acordo com as recomendações do fabricante. O protocolo utilizado em cada reação foi constituído de uma mistura contendo 2  $\mu$ L de terminadores marcados (*terminator ready reaction mix-Applied Biosystems by life*), composto de *A-Dye Terminator*, *G-Dye Terminator*, *C-Dye Terminator*, *T-Dye Terminator*, dGTP, dATP, dCTP, dTTP, Tris- HCl pH 9,0,  $\text{MgCl}_2$ , *Pirofosfato* Termo-estável e *AmpliTaq* DNA Polimerase, *Df*, 2  $\mu$ L de tampão de sequenciamento 2,5 x (*Applied Biosystems by life*), 1  $\mu$ L de produto da *Nested*-PCR, 10 pmol de cada *primers* (os mesmos da *nested*-PCR), em

reações separadas e água deionizada autoclavada em quantidade suficiente para um volume final de 25 µL. A reação foi realizada em termocilador (*Thermo Hybaid/CE 3832*), programado para 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

#### 5.4.3.7 Precipitação do produto da reação de sequenciamento

Foram adicionados 10 ml do *BigDye XTerminator® Purification Kit* nos poços utilizados, em seguida foram adicionados 45 ml do *San solution*, foi adicionados 10 ml da reação de sequenciamento no fundo da placa, com pipetas multicanais, e após isto a placa foi selada. Agitou-se por 30 minutos (1800 rpm) em seguida, isto centrifugado por 8 minutos a 1000 rpm.

#### 5.4.4 Eletroforese capilar do DNA sequenciado

Os produtos foram submetidos à eletroforese capilar no Sequenciador automatizado de DNA (modelo *ABI3130 Applied Biosystems by life*). Os fragmentos de DNA marcados com corantes fluorescente se moveram através de um feixe de laser até atingir o eletrodo positivo, onde o dispositivo de detecção óptica detectou a fluorescência, converteu o sinal de fluorescência em dados digitais, para em seguida, registrá-los em um arquivo AB1. Quando excitado pelo laser, cada corante emitiu luz de comprimento de onda diferente e todas as quatro cores, correspondente às quatro bases, foram detectadas e diferenciadas em uma injeção capilar.

#### 5.4.5 Análise das sequências

As sequências do gene *omp1* foram alinhadas e editadas no programa *Ugene Integrated Bioinformatics Tools* (versão 1.16; [<http://www. http://ugene.unipro.ru/>]). Sequências de genótipos da espécie CT disponíveis no *GenBank* foram utilizadas para análise de comparação com cada amostra testada utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) nucleotídeo-padrão de pesquisa no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (<http://.ncbi.nlm.nih.gov/> BLAST). Na formação da árvore das sequências nucleotídicas deste estudo e daquelas importadas do *GenBank* foi utilizada inferência filogenética utilizando o método *neighbor-joining*, com modelo de correção Kimura-2-parâmetros no programa MEGA (versão 5.0; Tamura, Dudley, Nei and Kumar [<http://www.megasoftware.net/>]).

**Quadro 04:** Sequências do gene *omp1* da *Chlamydia trachomatis* depositados no *GenBank* e utilizadas para comparação com as sequências do estudo.

Cepa	Genótipo	Nº de acesso do <i>GenBank</i>
F/IC-CAL3	F	DQ064287
E/Bour	E	DQ064286
J/UW-36	J	DQ064292
I/UW-12	I	DQ064290
D/UW-3	D	DQ064284
D/IC-CAL8	D	DQ064285
L3/404	L3	DQ064296
UW-12	I	DQ064290
Ia/870	Ia	DQ064291
H/580	H	DQ064289
UW/31	K	DQ064293
TW3	C	DQ064283
G/392	G	DQ064288
L2/434	L2	DQ064295
B/TW-5	B	DQ064281
B/Tunis-864	B	DQ064280
Ba/Apache-2	Ba	DQ064282
L1/440	L1	DQ064294
E/Bour	E	DQ064286
D/UW-3	D	DQ064284
D/IC-CAL8	D	DQ064285

#### 5.4.6 Local da realização das diferentes etapas

As amostras de material cervical foram coletadas no Laboratório de Citopatologia/ICB/UFPA, onde também foi realizada a análise citológica e o preenchimento dos questionários. Para os procedimentos moleculares, o material foi transportado para o Laboratório de Biologia Molecular e Celular (LBMC) do Núcleo de Medicina Tropical



(NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foi realizada a extração de DNA, reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR) para os genes da  $\beta$ -globina humana e *omp1* e eletroforese no gel de agarose a 1%, com brometo de etídio (0,5mg/mL), visualizadas sob Luz ultravioleta (UV). O sequenciamento nucleotídico e a genotipagem foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular, da Seção de Bacteriologia e Micologia do Instituto Evandro Chagas, Belém do Pará.

#### **5.4.7 Descrição das variáveis e/ou indicadores do estudo e o processo de obtenção dos dados**

Os questionários aplicados foram divididos nas seguintes etapas: dados sócio-epidemiológicos e de queixas ginecológicas. Os dados sociais incluídos foram idade, curso, matrícula e estado civil. Nos dados socio-epidemiológicos foram incluídas se é fumante, início da vida sexual, número de parceiros desde o início da vida sexual, vida sexual atualmente ativa, parceiro fixo, uso de preservativo, uso do anticoncepcional, se já apresentou algum problema ginecológico, realização de exame preventivo anualmente. Em relação à sintomatologia foi incluído: apresenta corrimento, odor, prurido/coceira, ardência ao urinar, dor durante o ato sexual, sangramento durante o ato sexual, sangramento fora do período menstrual (apêndice A).

#### **5.5 NORMAS ÉTICAS**

O TCLE foi empregado antes do ato da pesquisa para que cada participante se torne conhecedora dos objetivos, riscos e benefícios da mesma, e sigilo das informações pessoais fornecidas.

Apesar da possibilidade mínima de riscos de ordem física ou emocional relacionados ao estresse ou incômodo causado no momento da coleta, foram tomadas medidas para que estes riscos fossem minimizados como o esclarecimento prévio às estudantes sobre os procedimentos de coleta, treinamento e avaliação dos profissionais envolvidos.

Para evitar os riscos de contaminações ou acidentes o uso de equipamento de proteção individual foi imprescindível durante as coletas do material biológico, sendo as coletas foram realizadas por profissionais experientes, com material estéril e descartável que foi aberto pela primeira vez diante do participante.

Este trabalho deu continuidade à pesquisa intitulada de “detecção e genotipagem de *Chlamydia trachomatis* em estudantes universitárias atendidas no laboratório de citopatologia/UFPA: análise citológica e molecular” que já se encontra aprovada pelo Comitê

de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, sob o parecer 103.571 (apêndice A).

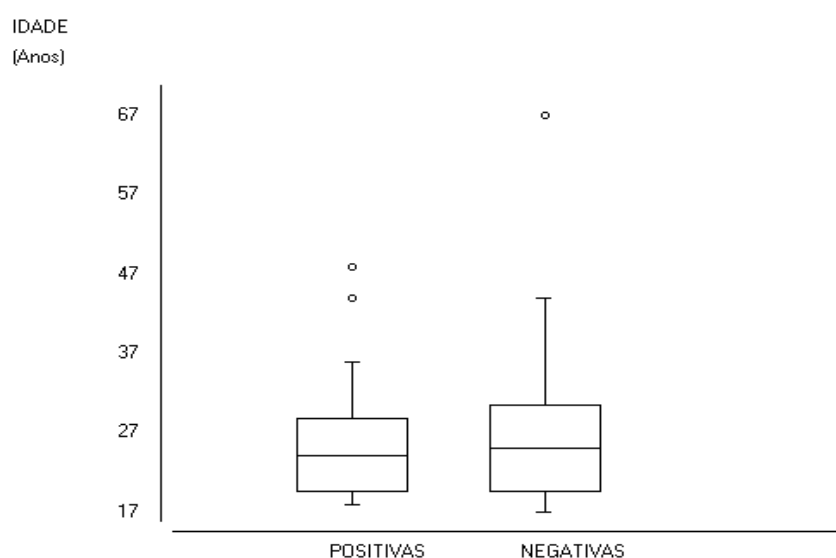
## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados em banco de dados utilizando-se o programa Excel 2007. O cálculo de prevalência foi aplicado, indicando o número de pessoas com a característica pesquisada em um grupo populacional, em determinado ponto do tempo. O programa *Bioestat* 5.0 foi utilizado para a análise descritiva e aplicação do teste estatístico. O *pvalor* menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo com o intervalo de confiança de 95%. O teste *de Mann-Whitney* foi utilizado para a média de idade e o teste do qui-quadrado foi utilizado para verificar a associação dos fatores sócio-epidemiológicos, e de queixas ginecológicas com a positividade da infecção por CT.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA POPULAÇÃO INVESTIGADA

Participaram do estudo 438 estudantes universitárias, a idade dessas estudantes variou entre 17 a 67 anos, a média de idades foi de 25,11 anos, mediana de 24 anos (IC 95%,  $\pm 5.89$ ). A idade média entre as positivas para a infecção foi de 25 anos (IC 95%,  $\pm 6.08$ ), com escores de 18 anos a 48 anos. Entre as negativas para a infecção, a média foi de 25,11 anos (IC 95%,  $\pm 5.86$ ), com escores de 17 anos a 67 anos (figura 06).



**Figura 06:** Box Plot da média e desvio padrão da idade das estudantes universitárias positivas e negativas para a infecção cervical por *Chlamydia trachomatis*.

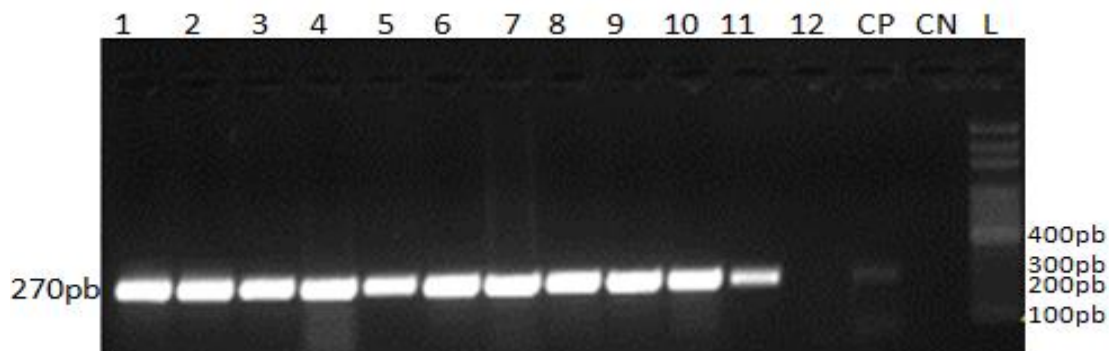
**Fonte:** Arquivo da pesquisa.

De toda população de estudo 86,8% declararam ser solteiras, 97,7% não faziam uso do tabaco, 95,2% iniciaram a vida sexual acima de 15 anos, 64,8% declararam usar preservativo nas relações sexuais, 52,3% não tinham parceiro sexual fixo e 86% tiveram, em média, um parceiro durante a vida sexual (tabela 1).

### 6.2 DETECÇÃO MOLECULAR DA *Chlamydia trachomatis*

As 436 amostras que foram submetidas ao processo de extração, amplificaram o fragmento de 270 pb do gene da  $\beta$ -globina humana, que foi utilizado como controle de qualidade para o processo de extração de DNA (figura 07). Duas amostras só foram

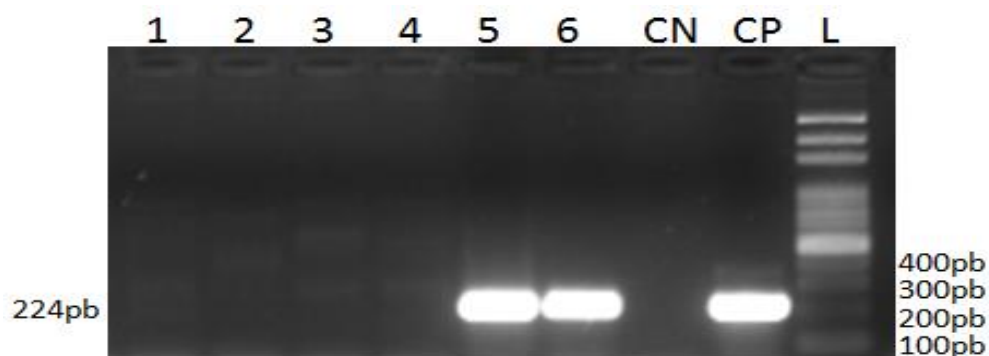
visualizadas, quando submetidas ao mesmo protocolo com alteração no volume de proteinase K para 4  $\mu$ L.



**Figura 07:** Foto documentação da amplificação do fragmento de 270pb do gene  $\beta$ -globina humana em gel de agarose a 1%.

**Fonte:** Fotodocumentação de amplificação do fragmento de 270 pb do gene da  $\beta$ -globina em gel de agarose a 1%. Arquivo da pesquisa, obtido em transluminador (*Vilber Lourmat*) no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará. 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11: amostras positivas, 12: amostra negativa. CP: controle positivo, CN: controle negativo, L: marcador de Peso molecular de 100pb plus DNA *Ladder* (*Invitrogen*®).

Após a amplificação do gene da  $\beta$ -globina humana, todas as amostras foram submetidas à técnica de *Seminested-PCR*, que detectou o fragmento de 224pb do gene estrutural *omp1* de CT em apenas 55 amostras, na qual se mostraram positiva para a infecção (figura 08), e com isso, a prevalência geral da infecção cervical por CT em estudantes de universidade pública foi de 12,5% (55/438).

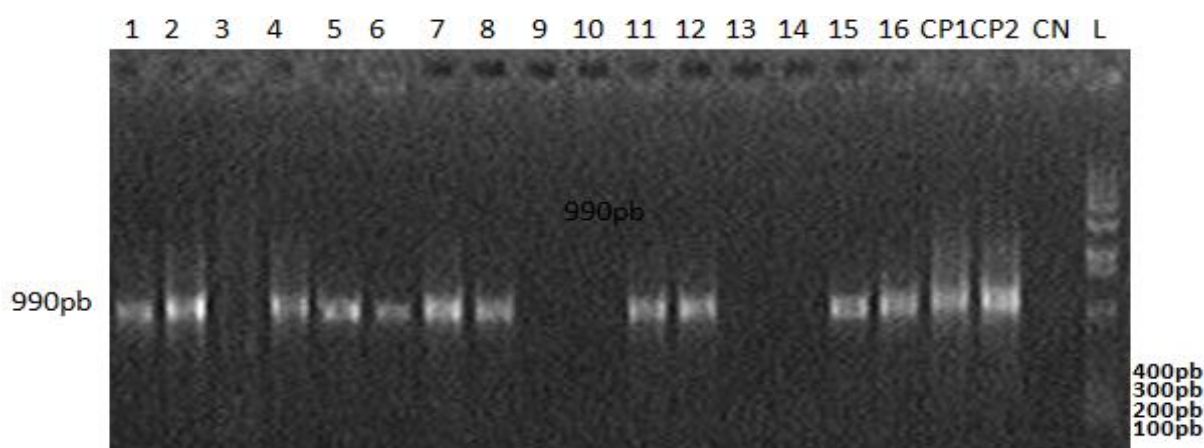


**Figura 08:** Foto documentação da amplificação do fragmento de 224pb do gene *omp1* de *Chlamydia trachomatis* em gel de agarose a 1%.

**Fonte:** Arquivo da pesquisa, obtido em transluminador (*Vilber Lourmat*) no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará. 1-2-3-4: amostras negativas, 5-6: amostras positivas, CN: controle negativo, CP: controle positivo, L: marcador de Peso molecular de 100pb plus DNA *Ladder* (*Invitrogen*®).

### 6.3 IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE *Chlamydia trachomatis*

Apenas dezesseis (16/55) amostras de DNA positivas para CT da população de estudo e dois controles positivos foram submetidas a amplificação do fragmento de 990pb do gene *omp1* para o sequenciamento nucleotídico. Destas, em cinco amostras não foi visualizado amplificação do respectivo fragmento, totalizando onze amostras que foram qualitativamente escolhidas para a genotipagem (figura 09).



**Figura 09:** Foto documentação da amplificação do fragmento de 990pb do gene *omp1* de *Chlamydia trachomatis* em gel de agarose a 1%.

**Fonte:** Arquivo da pesquisa, obtido em transluminador (*Vilber Lourmat*) no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Sessão de Bacteriologia e Micologia, Instituto Evandro Chagas. 1-2-4-5-6-7-8-11-12-15-16: amostras que amplificaram o fragmento para sequenciamento, 3-9-10-13-14: amostras positivas que não amplificaram o fragmento para sequenciamento, CP1: controle positivo 1, CP2: controle positivo 2, L: marcador de Peso molecular de 100pb plus DNA *Ladder* (*Invitrogen*®), CN: controle negativo.

### 6.4 CARACTERÍSTICAS SOCIO-EPIDEMIOLÓGICAS DAS ESTUDANTES POSITIVAS PARA A INFECÇÃO

A infecção por CT foi identificada em mulheres com média de idade inferior a 25 anos, em 12,9% das universitárias solteiras, em 30% das que declararam uso do tabaco, em 13,6% daquelas que relataram não usar preservativo durante as relações sexuais, em 19% das que iniciaram a vida sexual antes dos 15 anos de idade e em 16,3% das estudantes que tinham em média mais de um parceiro durante a vida sexual, porém, nenhuma destas frequências foi expressiva frente ao grupo das estudantes sem a infecção (tabela 01).

**Tabela 1- Características sócio-epidemiológicas das estudantes universitárias em Belém, Pará, Brasil (n=438)**

	Total (n=438) n (%)	CT positivo (n=55) n (%)	CT negativo (n=383) n (%)	p valor
<b>Idade (anos)</b>	25,11±5,89	24,9 ±6,08	25,1±5,86	<b>0,8000</b>
<b>Estado civil</b>				
<b>Solteira</b>	380 (86,7)	49 (12,9)	331 (87,1)	<b>0,7390</b>
<b>Casada</b>	58 (13,2)	6 (10,3)	52 (89,6)	
<b>Fumante</b>				<b>0,2787</b>
<b>Sim</b>	10 (2,3)	3 (30,0)	7 (70)	
<b>Não</b>	428 (97,7)	52 (12,2)	376 (87,8)	
<b>Idade do início da vida sexual (anos)</b>				<b>0,5756</b>
<b>&lt;15</b>	21(4,8)	4 (19)	17 (80,9)	
<b>≥15</b>	417(95,2)	51(12,2)	366 (87,7)	
<b>Usa preservativo</b>				<b>0,7156</b>
<b>Sim</b>	284 (64,8)	34 (11,9)	250 (88)	
<b>Não</b>	154 (35,1)	21 (13,6)	133 (86,3)	
<b>Parceiro fixo</b>				<b>0,1708</b>
<b>Sim</b>	209 (47,7)	21(10)	188 (89,9)	
<b>Não</b>	229 (52,3)	34 (14,8)	195 (85,1)	
<b>Média de parceiros na vida sexual</b>				<b>0,8854</b>
<b>≤1</b>	377 (86,1)	45 (11,9)	332 (88)	
<b>&gt;1</b>	61 (13,9)	10 (16,3)	51 (83,6)	

Para o cálculo do *pvalor* em variáveis contínuas, os dados são apresentados ± DP (desvio padrão), e utilizou-se o teste do *Qui-quadrado* ( $\chi^2$ ); e o cálculo do *pvalor* para a variável de idade, utilizou-se o *Mann-Whitney*.

## 6.5 QUEIXAS GINECOLÓGICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

O corrimento vaginal foi queixa ginecológica mais frequente nas estudantes universitárias (66,6%) no entanto, apesar de se apresentar como o mais relatado pelas estudantes com a infecção por CT (72,7%), sua ocorrência também se mostrou expressiva no grupo de mulheres não infectadas (65,8%). Entre os relatos das queixas ginecológicas

(corrimento vaginal, odor forte, prurido, dismenorréia, colporragia e disúria), não foi identificada diferença significativa na frequência dos sintomas (tabela 2).

**Tabela 2- Queixas ginecológicas das estudantes universitárias em Belém, Pará, Brasil (438)**

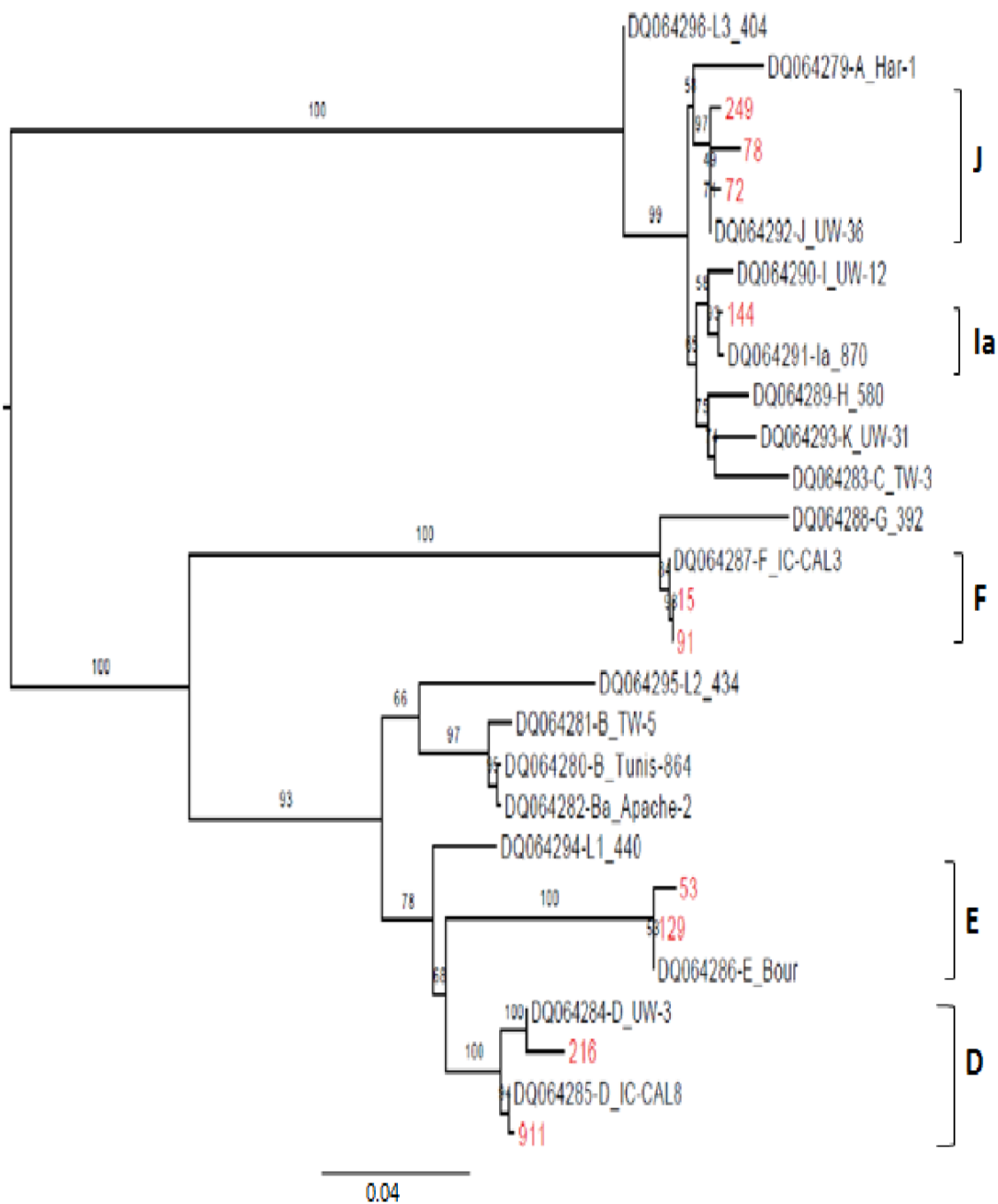
	Total (n=438) n (%)	CT positivo (n=55) n (%)	CT negativo (n=383) n (%)	P valor
<b>Corrimento vaginal</b>	292 (66,6)	40 (72,7)	252 (65,8)	<b>0,3861</b>
<b>Odor</b>	75(17,1)	7 (12,7)	68 (17,8)	<b>0,4629</b>
<b>Prurido</b>	114(26)	14 (25,5)	100 (26,1)	<b>0,9515</b>
<b>Dismenorreia</b>	34(7,7)	3 (5,4)	31 (8,1)	<b>0,6706</b>
<b>Colporragia</b>	144(32,9)	15 (27,3)	129 (33,7)	<b>0,4280</b>
<b>Disúria</b>	65(14,8)	5 (9)	60 (15,7)	<b>0,2802</b>

Os dados das variáveis categóricas são representados por n (%).

## 6.6 GENÓTIPOS E OS FATORES EPIDEMIOLÓGICOS E DE QUEIXA GINECOLÓGICA IDENTIFICADOS

Das 11 amostras que amplificaram 990pb do gene de *omp1* de CT, foram submetidas a análise e identificação do genótipo, ao serem comparadas com as sequências depositadas no *GenBank* (figura 10).

O quadro 5 mostra os genótipos identificados nas amostras de secreção cervical das estudantes universitárias, bem como as respectivas características socio-epidemiológicas e de queixas ginecológicas apresentadas por cada participante do estudo com resultado positivo para CT, na qual foi realizado a genotipagem.



**Figura 10:** Árvore filogenética das cepas de *Chlamydia trachomatis* detectadas em amostras de secreção cervical de estudantes universitárias e as disponíveis no *GenBank*; amostras utilizadas no estudo (249,78, 72, 144, 15, 91, 53, 129, 216, 911).

**Fonte:** Arquivo da pesquisa.



O mais frequente entre a população estudada foi o genótipo J, que foi encontrado em quatro estudantes (36,3%), seguido dos genótipos D (18,2%), E (18,2%), e F (18,2%) que respectivamente, apresentaram as mesmas frequências. O Ia (9,1%), foi o menos prevalente dentre a população estudada, sendo, cada um, encontrado em apenas uma amostra.

**Quadro 05:** Genótipos encontrados em amostras de secreção cervical e características sócio-epidemiológicas e de queixas ginecológicas das estudantes universitárias positivas para a infecção por CT. Para sim (X) e não (-).

AMOSTRAS											
	15EST	53EST	72EST	78EST	91EST	129EST	144EST	216EST	242EST	249EST	911EST
GENÓTIPOS	F	E	J	J	F	E	Ia	D	J	J	D
Idade (anos)	26	25	23	21	24	23	28	26	24	20	36
Solteira	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	-
Casada	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X
Fumante	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sim	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-
Não	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
Idade do início da vida sexual (anos)											
<15	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-
≥15	X	X	X	-	X	X	-	X	X	X	X
Média de parceiro sexual na vida											
≤1	X	-	-	-	-	X	X	-	-	-	X
>1	-	X	X	X	X	-	-	X	X	X	
Usa preservativo											
Sim	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X	-
Não	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-	X
Parceiro fixo											
Sim	X	-	-	X	-	X	-	X	X	X	X
Não	-	X	X	-	X	-	X	-	-	-	-
Sintomatologia	Dor		Dor	Corrimento	Dor		Dor	Corrimento	Prurido	Prurido	Dor
	Corrimento	-	Corrimento		Corrimento	-	Corrimento		Corrimento	Corrimento	Corrimento

Das universitárias, nas quais foram realizada genotipagem em suas respectivas amostras endocervicais, dez (90,9%) declararam serem solteiras, não foi declarado o uso do tabaco por nenhuma estudante, nove (81,8%) declararam ter início da relação sexual com idade igual ou

superior a quinze anos, sete (63,6%) afirmaram ter tido mais de um parceiro durante toda a vida sexual, oito (72,2%) não usam preservativo durante as relações sexuais, sete (63,6%) admitiram ter parceiro sexual fixo. Porém nove estudantes (81,8%) apresentaram sintomatologia do trato geniturinário inferior, destes, 100% estavam associados ao corrimento vaginal.

## 7 DISCUSSÃO

Este é um estudo pioneiro que demonstrou a prevalência da infecção cervical por CT (12,5%) em estudantes universitárias de Belém, no Estado do Pará, na Região Amazônica, Norte do Brasil. Esta prevalência não diferenciou significativamente dos resultados encontrados em outras populações femininas brasileiras variadas atendidas em clínicas de ginecologia nos estados do Rio Grande do Sul (12,6%) (IGNASI *et al*, 2012), em Goiás (9,6%) (LIMA *et al*, 2014), Rio Grande do Norte (10,9%) (MAGALHÃES *et al*, 2014) e Vitória (8,8%) (MIRANDA *et al*, 2004). Por outro lado, em Manaus, a prevalência (4,3%) encontrada foi inferior à encontrada no presente estudo (SILVA *et al*, 2012).

Prevalências mais elevadas da infecção foram encontradas em populações femininas apenas na Bahia (31%) (MACHADO *et al*, 2012) e em Pernambuco (23,8%) (TAVARES *et al*, 2014). No entanto, estes dois estudos podem apresentar um viés amostral, que pode estar relacionado ao número reduzido de participantes na pesquisa, que pode não nos dar melhor amplitude na visibilidade dos casos. Não há relatos de estudos sobre infecções por CT em estudantes universitários no Brasil, o que contribui para o desconhecimento sobre a epidemiologia desta infecção sexual, além de que, apesar de apresentar prevalência significativamente semelhante, a nossa população de estudo apresenta grau de escolaridade elevada, diferente das populações dos estudos mencionados.

Estudos internacionais demonstram baixas prevalências desta infecção em populações variadas, como em mulheres menores de vinte e quatro anos na Espanha (4%) (FERNÁNDEZ-BENÍTEZ *et al*, 2013), em mulheres de baixa escolaridade e com até um parceiro sexual no Zimbaube, Rússia, China, Peru e Austrália (4,6%) (DETELS *et al*, 2011) e na população feminina dos Estados Unidos (8%) (CDC, 2011).

Frente às investigações realizadas especificamente em estudantes universitárias, a prevalência encontrada neste estudo está em concordância com os achados de James e colaboradores, que pesquisaram a infecção por CT em estudantes universitários de Alabama, Mississippi e Georgia e, encontraram uma prevalência de 9,7% (JAMES *et al*, 2008), assim como um estudo que obteve prevalência de 5,9% na Argentina (OCCHIONERO *et al*, 2015). Na Inglaterra, a prevalência desta infecção em estudantes universitários foi mais baixa (3,4%)(ALDEEN *et al*, 2010).

Na Nigéria, a detecção sorológica de CT em universitários atingiu uma prevalência de 30,2% (UGBOMA *et al*, 2014), entretanto apenas neste último, não foram utilizadas as

metodologias baseadas na biologia molecular, principalmente das técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, as quais são atualmente recomendadas para a detecção molecular e por serem de alto nível de sensibilidade e especificidade (CDC, 2014).

Entre as estudantes com a infecção, a maioria apresentava variabilidade de parceiros sexuais e declararam não usarem preservativo durante a relação sexual, isto é, estão mais expostas ao risco de contaminação sexual por CT. A falta de constância no uso do preservativo durante as relações sexuais dificulta, necessariamente, a redução das taxas de infecções deste tipo, e inviabilizam as medidas de profilaxia e controle das IST (FERNÁNDEZ-BENÍTEZ *et al*, 2013). Além disso, as estudantes universitárias já se encontram em nível acadêmico, e por isto, são oriundas de escolaridade básica, onde de acordo com os Parâmetros Curriculares Nacionais para o Ensino Médio (PCN), é o momento que são trabalhadas questões de conhecimento básico sobre IST, bem como as respectivas medidas profiláticas, como o uso do preservativo durante as relações sexuais (BRASIL, 2006).

A principal queixa ginecológica entre as estudantes universitárias foi o corrimento vaginal, sendo a maior já encontrada em estudos brasileiros deste tipo (SILVA *et al*, 2012; MACHADO *et al*, 2012). Apesar de evoluir com caráter predominantemente assintomático, quando presente, os sintomas da infecção por CT são inespecíficos, como o corrimento vaginal, que é uma condição clínica que pode estar associado a outras etiologias de origem bacteriana ou parasitológica (AFRAKHTEH *et al*, 2013).

O genótipo J apresentou maior frequência em amostras endocervicais das estudantes universitárias e embora alta prevalência do genótipo J não ser amplamente relatada, nossos resultados estão de acordo com estudos de Taiwan, que em população feminina que apresenta risco de co-infecção por HIV e outras IST, na qual observou-se uma alta prevalência de 27,3% deste genótipo e não foi demonstrada nenhuma associação significativa dos sintomas geniturinários das participantes da pesquisa a nenhum genótipo encontrado (YANG *et al*, 2013). Em quatro províncias da China, Han e colaboradores observaram que o genótipo J permaneceu entre os mais prevalentes, com 16,3 % das infecções urogenitais (HAN *et al*, 2013).

Nossos resultados não estão de acordo com algumas evidências científicas, que mostram o genótipo J é encontrado em baixas frequências. Beni e colaboradores encontraram uma das mais baixas frequências do genótipo J, com 1,9% em mulheres entre 25 e 34 anos, verificando que houve significância apenas entre os genótipos E/Ga com a presença de sintomatologia, e

mesmo assim, não realizaram a investigação de outras infecções, para diminuir as chances de confundidores (BENI *et al*, 2010). O genótipo J foi detectado com uma baixa frequência de 5% das infecções nos heterossexuais de Armsterdan (BOM *et al*, 2013).

Ao considerar que as infecções sexuais por CT são de caráter tipicamente assintomático, o presente estudo mostra dados pouco relatados, no qual, é observada alta frequência de sintomas genitais nas participantes da pesquisa que positivamente para a infecção (ELEUTÉRIO *et al*, 2007; BAUD *et al*, 2011; GEISLER & STAHHM, 2011; MANIA-PRAMANIK *et al*, 2012). Apesar do número de amostras genotipadas permanecer pequeno neste estudo, este mostra-se importante, pois possibilita o alerta para a necessidade de pesquisas específicas no rastreio e identificação dos genovares de CT que circulam em populações diversificadas e/ou diferenciadas e para a real distribuição dos genótipos nas mesmas.

No presente estudo, os genótipos D e E demonstraram uma baixa prevalência, estando de acordo com o estudo realizado com mulheres mexicanas que apresentavam infertilidade, onde mostrou-se com menor prevalência, correspondendo 4,5% das infecções causados pelo genótipo D. O genótipo E foi encontrado em 8,7% das infecções sexuais, no entanto, estas mulheres, que participaram do estudo, apresentaram-se totalmente assintomáticas (HARO-CRUZ *et al*, 2011).

Nossos resultados mostraram discordância de muitos dos trabalhos que abordam a genotipagem de CT, onde é observada a alta prevalência dos genótipos D e E. Em um estudo de genotipagem, através da técnica de *Restriction Fragmente Lenght Polymorphism* (RFLP), com mulheres profissionais do sexo na Hungria, o genótipo D representou 34,4% das infecções seguido do genótipo E com a prevalência de 21,9% (PETROVAY *et al*, 2009). Utilizando a mesma técnica para a genotipagem, no Irã as mulheres sintomáticas que freqüentam clínicas de atendimento para IST, o genótipo E mostrou maior prevalência, sendo uma das maiores já encontradas 31,5%. O genótipo D permaneceu entre os três mais prevalentes, representando 13% das infecções (BENI *et al*, 2010).

No Brasil, são poucos os registros de genotipagem de CT por biologia molecular. Lima e colaboradores foram os primeiros a sequenciarem e genotiparem genótipos sexuais de CT, e verificaram alta taxa de infecções pelo genótipo D (33,4%), contrastando aos resultados da presente pesquisa, que além do genótipo D ter sido menos prevalente, o número amostral manteve-se superior ao trabalho mencionado (LIMA *et al*, 2007).

O resultado do presente estudo não está em concordância com os de Magalhães e colaboradores, ao realizar uma pesquisa do rastreio de genótipos já pesquisados no Brasil,

evidenciaram a maior prevalência do genótipo E (39,3%), F (16,6%), sendo o genótipo D (15,9%), estando em terceiro mais prevalente. Porém mostraram potencial significância, dos genótipos H e J com sintomas de corrimento uretral e disúria em homens e dos genótipos F e G com dores abdominais em mulheres (MAGALHÃES *et al*, 2011).

O corrimento vaginal foi a principal queixa ginecológica relatada entre todas as estudantes que continham a infecção pelo genótipo J. Entretanto, mesmo que alguns genótipos podem estarem associados aos sintomas ginecológicos, a sintomatologia geniturinária pode estar associada a outras etiologias, sendo necessária a pesquisa de potenciais confundidores (AFRAKHTEH *et al*, 2013).

Limitações desta pesquisa podem ser encontradas no viés amostral, que pode estar associado à demanda espontânea da população de estudo, do número pequeno de amostras genotipadas, além da resposta ao questionário, uma vez que a participante da pesquisa pode não responder ao questionário e/ou respondê-lo de acordo com medidas socialmente aceitáveis atualmente, que poderá mascarar suas condutas originais, e que foi fator determinante do tamanho modesto da nossa amostra.

## 8 CONCLUSÃO

- O maior grau de instrução não está garantindo baixas taxas de infecção cervical por CT, e que os genótipos J, Ia, F, E e D não mostraram diferenças significativas nas frequências entre as estudantes universitárias.
- Esforços sejam feitos para ampliação dos estudos de triagem molecular da infecção sexual causada por *Chlamydia trachomatis*, bem como averiguar a distribuição dos respectivos genótipos circulantes em populações diferenciadas.
- A investigação dos casos assintomáticos se mostra como importante medida para a prevenção aos danos tardios recorrentes, para a melhoria da saúde reprodutiva humana e para a qualidade de vida da população.

## 9 REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, Y.,M.; BELLAND, R.,J. The chlamydial developmental cycle. Federation of European Microbiological Societies. **Microbiology** 29: 949–959, 2005.

ANDREASEN, A. A.; BURTON, M. J.; HOLLAND, MARTIN J.; POLLEY, S.; FAAL, N.; MABEY, D. C.W.; BAILEY, ROBIN L. *Chlamydia trachomatis* OMP1 Variants in Trachoma: What Do They Tell Us? **Plos Neglected Tropical Diseases**, volume 2, Issue 9 e 306, September, 2008.

AFRAKHTEH M, MAHDAVI A, BEYHAGHI H, MORADI A, GITY S, ZAFARGANDI S, ZONOUBI Z. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* in patients who remained symptomatic after completion of sexually transmitted infection treatment. **Iran J Reprod Med.** 11.(4) 285-292, 2013.

AGRAWAL, T.; VATS, V., SALHAN, S., MITTAL, A., Mucosal and peripheral immune responses to chlamydial heat shock proteins in women infected with *Chlamydia trachomatis*. **Clinical and Experimental Immunology** 148, 461–467, 2007.

AGRAWAL, T.; VATSA, V.; SALHANB, S.; MITTALA, A., The mucosal immune response to *Chlamydia trachomatis* infection of the reproductive tract in women. **Journal of Reproductive Immunology**, 83, 173–178, 2009.

APPROBATO, M. Gravidez ectópica. In: VADEMECUM de Clínica Médica, PORTO, C & PORTO, A., Eds 3ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 472, 2010.

BAUD, D; ZUFFEREY, J; HOHLFELD, P; GREUB, G., Performance of an automated multiplex immunofluorescence assay for detection of *Chlamydia trachomatis* immunoglobulin G. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Nov 27 de 2013.

BAUD, D.; GOY, G.; JATON, K.; OSTERHELD, M.; BLUMER, S.; BOREL, N.; VIAL, Y.; HOHLFELD, P.; POSPISCHIL, A.; GREUB, G.; Role of *Chlamydia trachomatis* in Miscarriage, review. **Emerging Infectious Diseases**, www.cdc.gov/eid, Vol. 17, N. 9, 2011.

BAUD, D; REGAN, L; GREUB, G. Emerging role of *Chlamydia* and *Chlamydia*- like organisms in adverse pregnancy outcomes. **Current Opinion in Infectious Diseases.** 21:70–6. 2008.

BAVOIL, P.; KALTENBOECK, B.; GREUB, G.; letter to the editor, In *Chlamydia veritas* DOI: 10.1111/2049-632X.12026 Final version published online 12 February. **Pathogens and Diseases**, 2013.



BÉBÉAR C; de BEYRBERAC, B., Genital *Chlamydia trachomatis* infections. **Clinical Microbiology and Infection**. 15:4–10, 2009.

BELL, S. D.; GEAR, J. H. S.; CORDON, F. B.; & JONES, B. R., The Nomenclature Of Isolates Of Virus From Trachoma And Inclusion Blennorrhoea. **Nature**, 197, 1963.

BELLAND, R. J.; ZHONG, G.; CRANE, D. D.; HOGAN, D.; STURDEVANT, D.; SHARMA, J.; BEATTY, W. L.; CALDWELL, H. D. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. v. 100, n. 14, 2005.

BELLAND, R. J.; ZHONG, G.; CRANE, D. D.; HOGAN, D.; STURDEVANT, D.; SHARMA, J.; BEATTY, W. L.; CALDWELL, H. D. Genomic transcriptional profiling of the developmental cycle of *Chlamydia trachomatis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. v. 100, n. 14, 2003

BENDER, N.; HERRMANN, B.; ANDERSEN, B.; HOCKING, J.S.; BERGEN, MORGAN, J.; BROEK, I. V.F.; ZWAHLEN, M.; LOW N. *Chlamydia* infection, pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy and infertility: cross-national study. **Sexually Transmitted Infections**. doi:10. 1-8, 2011.

BENI, B. T.; MOTAMEDI, H.; ARDAKANI, M. R. Genotyping of the prevalent *Chlamydia trachomatis* strains involved in cervical infections in women in Ahvaz, Iran, **Journal of Medical Microbiology**. 59, 1023–1028, 2010.

BENZAKEN, A. S.; SALES, D. N.; PALHETA JUNIOR, J. I. L.; PEDROSA, V. L.; GARCIA, E. G. Prevalência de infecção por clamídia e Gonococo em mulheres atendidas na clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazona. **DST- J Brás Sex Transm**. v. 22, n. 3, p.129 -134, 2010.

BOM, R.J.M.; HELM, J.J.V.D.; LOEFF, M.F.S.V.D.; ROOIJEN, M.S.V.; HEIJMAN, T.; MATSER, A.; VRIES, H.J.C.; BRUISTEN, S.M. Distinct Transmission Networks of *Chlamydia trachomatis* in Men Who Have Sex with Men and Heterosexual Adults in Amsterdam, The Netherlands. 8 , 53869, 2013.

BORBOREMA-ALFAIA AP, FREITAS NS, ASTOLFI FS, BORBOREMA-SANTOS CM. *Chlamydia trachomatis* infection in a sample of northern Brazilian pregnant women: prevalence and prenatal importance. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**., Sep-Oct; 17(5): 545-550, 2013.

BHENGRAJ, A. R.; SRIVASTAVA, P. & MITTAL, A. Lack of mutation in macrolide resistance genes in *Chlamydia trachomatis* clinical isolates with decreased susceptibility to azithromycin. **International Journal of Antimicrobial Agents** 38, 178–179, 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, **Diagnóstico laboratorial da *Clamídia***. p 63, il. (Série TELELAB), 1997(a).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Diagnóstico laboratorial da Clamídia.- Brasília: **Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS**. 1997 (b).

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Políticas de Saúde, **Programa Nacional de DST e Aids Técnicas para Coleta de Secreções**, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Saúde e prevenção nas escolas : guia para a formação de profissionais de saúde e de educação / Ministério da Saúde**. Brasília. 2006.

BRUNHAM, R. C. & REY-LADINO, J., “Immunology of *Chlamydia* infection: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine,” **Nature Reviews Immunology**, vol. 5, no. 2, pp. 149–161, 2005.

BYRNE, G. I., *Chlamydia trachomatis* Strains and Virulence: Rethinking Links to Infection Prevalence and Disease Severity, **Journal the Infectious Diseases**, 201 (Suppl 2), S126 – S136, 2010.

CARLSON, J. H. ; WHITMIRE, W. M.; WICKE, D. D. C. L. ; VIRTANEVA, K.; STURDEVANT, D. E.; KUPKO III, J. J., PORCELLA, S. F.; MARTINEZ-ORENGO, N.; HEINZEN, R. A.; KARI, L.; CALDWELL, H. D. The *Chlamydia trachomatis* Plasmid Is a Transcriptional Regulator of Chromosomal Genes and a Virulence Factor. **Infection and Immunity**. v. 76, n. 6, p. 2273 - 2283, 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Screening Tests To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections**, 2002

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Academy for Educational Development, Summary of a review of the literature: **programs to promote *Clamydia* screening**, 2007.

CENTERS FOR DISEASE FOR CONTROL AND PREVENTION SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES (STDs) **Prevention, Pelvic Inflammatory Disease (DIP) module**, Ready-to-Use STD Curriculum for Clinical Educators PID Module May, 2009.

CENTERS FOR DISEASE FOR CONTROL AND PREVENTION SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES (STDs), **Treatment guidelines**, 2010, MMWR, v. 59, n. RR-12, p 44-49, 2010.

CENTERS FOR DISEASE FOR CONTROL AND PREVENTION, Morbidity and mortality weekly report. CDC Grand Rounds, **Chlamydia Prevention: Challenges and Strategies for Reducing Disease Burden and Sequelae**, 60(12); 370-373, 2011.

CENTERS FOR DISEASE FOR CONTROL AND PREVENTION SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES (STDs). *Chlamydia*. **Sexually Transmitted Diseases Surveillance**, 2012.

CENTERS FOR DISEASE FOR CONTROL AND PREVENTION (CDC). Recommendations for the Laboratory-Based Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* - 2014. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). **Recommendations and Reports**. / Vol. 63 / No. 2, 2014.

CENTERS FOR DISEASE FOR CONTROL AND PREVENTION (CDC). National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention, Division of STD Prevention, Sexually Transmitted Disease Surveillance 2013, December 2014.

CHENG, C.; JAIN, P.; BETTAHI, I.; PAL, S.; TIFREA, D.; DE LA MAZA, L.M.A TLR2 agonist is a more effective adjuvant for a *Chlamydia* major outer membrane protein vaccine than ligands to other TLR and NOD receptors. **Vaccine**. 29(38): 6641–6649, 2011.

CHOROSZY-KROL, I.; FREJ-MĄDRZAK, M.; JAMA-KMIECIK, A.; BOBER, T.; SAROWSKA, J. Characteristics of the *Chlamydia trachomatis* species – Immunopathology and Infections, reviews, **Advances in Clinical and Experimental Medicine**. 21, 6, 799–808, 2012.

CLARKE, I. N. Evolution of *Chlamydia trachomatis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1230, n. 2011, p. E11 - E18, 2011.

CORNETTA, M.C.M.; GONÇALVES, A.K.S.; BERTINI, A.M. Efficacy of Cytology for the Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in Pregnant Women, **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 10 (5):337-340, 2006.

CRICHTON J, HICKMAN M, CAMPBELL R, HERON J, HORNER P, MACLEOD J. Prevalence of *Chlamydia* in Young Adulthood and Association with Life Course Socioeconomic Position: Birth Cohort Study. **Plos One**, 9 (8), e104943, 2014.

DARVILLE, T. & HILTKE, T. J., “Pathogenesis of genital tract disease due to *Chlamydia trachomatis*,” **Journal of Infectious Diseases**, vol. 201, supplement 2, pp. S114–S125, 2010.

DEAN, D.; TURINGAN, R.S.; THOMANN, H.; ZOLOTOVA, A.; ROTHSCHILD, J.; JOSEPH, S.J.; READ, T.D.; TAN, E.; SELDEN, R.F.; A Multiplexed Microfluidic PCR Assay for Sensitive and Specific Point-of-Care Detection of *Chlamydia trachomatis*, **PLoS ONE**, v. 7, I. 12 e51685, 2012.

den HARTOG, J. E.; MORRÉ, S. A. & LAND, J. A. *Chlamydia trachomatis*-associated tubal factor subfertility: immunogenetic aspects and serological screening. **Human Reproduction Update**, V. 12, 719–730, 2006.

DETELS, R.; GREEN, A. M.; KLAUSNER, J. D.; KATZENSTEIN, D.; GAYDOS, C.; HANSDISFIELD, H. H.; PEQUEGNAT, W.; MAYER, K.; HARTWELL, T. D.; QUINN, T. C. The incidence and *Neisseria Gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 38, n. 6, p. 503-509, 2011.

DOMMELEN, L.; TIEL, F. H.; OUBURG, S. *et al.*, “Alarmingly poor performance in *Chlamydia trachomatis* point-of-care testing” **Sexually Transmitted Infections**, vol. 86, no. 5, p. 355–359, 2010.

EUROPEAN CENTER FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC): **Sexually transmitted infections in Europe**, 1990–2009. Stockholm: 2011.

ELEUTÉRIO, R. M. N.; JUNIOR, J. E.; GIRALDO, P. C.; MUNIZ, A. M. V., *Chlamydia trachomatis* Cervicitis in Sexual Actives Women From a Private Gynecologic Service, in Fortaleza City, **Role-based access control**, vol. 39(4): 287-290, 2007

EVERETT, K.; BUSH, R. M.; ANDERSEN, A. A., Emended description of the order Chlamydiales, proposal of *ParaChlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. Nov. each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards of the identification of organisms. **International journal of systematic bacteriology**, v. 49, p. 415 - 440, 1999.

FERNÁNDEZ-BENÍTEZ, C.; MEJUTO-LÓPEZ, P.; OTERO-GUERRA, L.; MARGOLLES-MARTINS, M. J.; SUÁREZ-LEIVA, P.; VAZQUEZ, F. Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection among young men and women in Spain. **BMC Infectious Diseases**, 13:388, 2013.

FISHER, D.,J.; FERNÁNDEZ, R, E.; MAURELLI, A.,T *Chlamydia trachomatis* transports NAD via the Npt1 ATP/ADP translocase. **Journal of Bacteriology**, 195(15):3381-6. 2013.

FLORES, B.C.T.C.P.; OLIVEIRA, A.V.; PIRES, M.M.; GOUVEIA, V.A.; BRENNAN, S.M.F.; *Chlamydia trachomatis* and female genital infections São Paulo, **Science in Health**, 2(1): 55-63, 2011.

GANZ, T., “Antimicrobial polypeptides,” **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 75, no. 1, pp. 34–38, 2004.

GAYDOS, C.A.; CARTWRIGHT, C.P.; COLANINNO, P; WELSCH, J; HOLDEN, J; *et al.* Performance of the Abbott RealTime CT/NG for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Journal of Clinic Microbiology** 48: 3236–3243. 2010.

GEISLER, W. M.; STAMM, W. E. Infecções por Clamídia. *In*: KLAUSNER, J., D.; HOOK III, E.,W. Doença sexualmente Transmissíveis – Currennt Diagnóstico e Tratamento. Rio de Janeiro: **Revinter**, Cap. 13, p. 75-83, 2011.

GOTTLIEB, SAMI L.; MARTIN, DAVID H.; XU, FUJIE; BYRNE, GERALD I.; BRUNHAM, ROBERT C. The Natural History and Immunobiology of *Chlamydia trachomatis*, Genital Infection and Implications for *Chlamydia* Control, **Suplemente article Summary**, S190, 201 (Supl 2), .JID 2010.

GRAYSTON, J.T. Infections caused by *Chlamydia pneumoniae* strain TWAR. **Clinical Infectious Diseases.**, 15: 757-63, 1992.

GRAYSTON, T., Biology of the virus, **Symposium on trachoma investigative ophthalmology**, october, 1963.

GEISLER, W.; M. Duration of Untreated, Uncomplicated *Chlamydia trachomatis* Genital Infection and Factors Associated with *Chlamydia* Resolution: A Review of Human Studies. *The Journal of Infectious Diseases*, V. 201, p. S104-S113, 2008.

GREER, C. E.; LUND, J. K.; MANOS, M. M. PCR amplification from paraffin- embedded tissues: recommendations on fixatives for Long-term Storage and prospective Studies. **PCR Methods Appl.** v.1, p. 46 - 50, 1991.

HARO-CRUZ, M. J.; DELEÓN-RODRIGUEZ, I.; ESCOBEDO-GUERRA, M.R.; LÓPEZ-HURTADO, M.; ARTEAGA-TRONCOSO, G.; ORTIZ-IBARRA, F.J.; GUERRA-INFANTE, F.M. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from cervical specimens of infertile Mexican women. **Enferm Infec Microbiol Clin.**;29(2):102–108. 2011.

HALBERSTAEDTER, L.; VON PROWAZEK, S. Ueber Zelleinschlisse parasitirer Natur Beim Trachom Arb a d Kaiserl. **Gesundheitsamt**, v. 3, p. 44-47. 1907.

HAMMERSCHLAG, M.R.;KOHLHOFF, S.A.; Treatment of chlamydial infections. **Expert Opin Pharmacother.** Mar;13(4):545-52. 2012.

HAN, Y.; YIN, Y.; SHI, M.; ZHONG, M.; CHEN, S.; XANG, Z.; JIANG, N.; CHEN, X. Difference in Distribution of *Chlamydia trachomatis* Genotypes among Different Provinces: a Pilot Study from Four Provinces in China. Short Communication. **Jpn. J. Infect. Dis.**, 66, 69-71, 2013.

HARRIS SR, CLARKE IN, SETH-SMITH HM et al. Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing. **Nature Genetics**, 44: 413–419. 2012.

HARKINS, L. & MUNSON, Erik, Molecular Diagnosis of Sexually Transmitted *Chlamydia trachomatis* in the United States, Review Article International Scholarly Research Network ISRN **Obstetrics and Gynecology** Volume 2011.

HAFNER, L.; BEAGLEY, K.; TIMMS, P. *Chlamydia trachomatis* infection: host immune responses and potential vaccines, **Nature publishing group**, review v. 1, n. 2, march 2008.

HAGGERTY C.L., GOTTLIEB S.L., TAYLOR B.D., ET AL. Risk of sequelae after *Chlamydia trachomatis* genital infection in women. **Journal of Infectious Diseases.**, 201(suppl 2): 134–155, 2010.

HECZKO, P.B.: Mikrobiologia, Podręcznik dla pielęgniarek, położnych i ratowników medycznych. **Wyd. Lek. PZWL**, Warszawa, 2007

HORNE, A.W.; STOCK, S. J.; KING, A. E., “Innate immunity and disorders of the female reproductive tract,” **Reproduction**, vol. 135, no. 6, pp. 739–749, 2008.

HUANG W.; GAYDOS C.A.; BARNES, M.R.; JETT-GOHEEN, M.; BLAKE, D.R. Comparative effectiveness of a rapid point-of-care test for detection of *Chlamydia trachomatis* among women in a clinical setting. **Sexually Transmitted Infection**. 2013 Mar;89(2):108-14.

ISOLA, J.; DE VRIES, S.; CHU, L. *et al.* Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1301-1308, Dec. 1994.

IGANSI, C.N.; SANTOS, V.K.; ROSA, M.I.; ROSA, T.M.; CALIL, L.N.; CRTEZ-HERRERA, E.; MONTANO, W.; ROSSETTI, M.L.R.; BOZZETTI, M.C. HPV and *Chlamydia trachomatis* genital infection among nonsymptomatic women: prevalence, associated factors and relationship with cervical lesions. **Caderno de Saúde Coletiva**. 20:287–296, 2012.

JALAL, H; STEPHEN, H; ALEXANDER, S; CARNE, C; SONNEX, C; Development of real-time PCR assays for genotyping of *Chlamydia trachomatis*. **Journal of Clinical and Microbiology**. 2007.

JALIL, E. M.; PINTO, V. M.; BENZAKEN, A. S.; RIBEIRO, D.; OLIVEIRA, E. C.; GARCIA, E. G.; MOHERDAUI, F.; BARBOSA, M. J. Prevalence of *Chlamydia* and

*Neisseria gonorrhoeae* infections in pregnant women in six Brazilian cities. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia.** v. 30, n. 12, p. 614 - 9, 2008.

JAMES AB, SIMPSON TY, CHAMBERLAIN WA. *Chlamydia* prevalence among college students: reproductive and public health implications. *Sex Transm Dis.* 35: 529–532, 2008.

JERCHEL, S.; KNEBEL, G.; KÖNIG, P.; BOHLMANN, M.K.; Rupp, J. A Human Fallopian Tube Model for Investigation of *Chlamydia trachomatis* Infections. **Journal of Visualized Experiments** (66), 2012.

KARI, L.; WHITMIRE, W. M.; CRANE, D. D.; REVENEAU, N. ; CARLSON, J. H.; GOHEEN, M. M.; PETERSON, E. M.; PAL, S.; LA MAZA, L. M.; CALDWELL, H. D. *Chlamydia trachomatis* Native Major Outer Membrane Protein Induces Partial Protection in Non-Human Primates: Implication for a Trachoma Transmission Blocking Vaccine. **Journal of Immunology**, v.182, n.12, p.8063 – 8070, 2009.

KIVIAT, N.B.; WOLNER-HANSEN, P.; ESCHENBACH, D.A.; ET AL. Endometrial histopathology in patients with culture-proved upper genital tract infection and laparoscopically diagnosed acute salpingitis. **American Journal of Surgical Pathology.** 14(2):167–175, 1990.

KLOTMAN, M. E. & CHANG, T. L., “Defensins in innate antiviral immunity,” **Nature Reviews Immunology**, vol. 6, no. 6, pp. 447– 456, 2006.

LAND, J.A.; VAN BERGEN, J.E.; MORRÉ, S.A.; POSTMA M.J. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Human Reproduction Update.* Mar-Apr;16(2):189-204, 2010.

LEWIS, D.; NEWTON, D.C.; GUY, R.J.; ALI, H.; CHEN, M.Y.; FAIRLEY, C.K.; HOCKING, J.S. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in Australia: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases.** 12:113, 2012.

LIMA, H. E.; OLIVEIRA, M.B.; VALENTE, B.G.; AFONSO, D.A. F.; DAROCHA, W.D.; SOUZA, M.C.M.; ALVIM, T.C.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; NORONHA, F.S. M. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* From Cervical Specimens in Brazil, **Sexually Transmitted Diseases**, Vol. 34, No. 9, p.709–717, 2007.

LIMA YA, TURCHI MD, FONSECA ZC, GARCIA FL, CARDOSO FAB, REIS MNG, GUIMARÃES EMB, ALVES RRF, CARVALHO NR, ALVES MFC. Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil. *International Journal of Infectious Diseases.* 2014, 25:16-21.

LI, Z.; CHEN, D.; ZHONG, Y.; WANG, S.; ZHONG, G. The Chlamydial Plasmid- Encoded Protein *pgp3* Is Secreted into the Cytosol of *Chlamydia*-Infected Cells. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 8, p. 3415 - 3428, 2008.

LI, YUEFENG; XIONG, LIKUAN; YAN, HUANG; XIA, YONG; ZHOU, HUA; XU, FEN; O'SULLIVAN, MATTHEW VN. As características clínicas e genótipo distribuição de *Chlamydia trachomatis* infecção em bebês com menos de seis meses de idade internada com pneumonia. **Infections, Genetics and Evolution**. V 29, 48-52. 2015.

LOW, N.; BENDER, N.; NARTEY, L.; SHANG, A.; STEPHENSON, J. M. Effectiveness of *chlamydia* screening: systematic review. **International Journal of Epidemiology**, 38:435–448, 2009.

MABEY, D.; FRASER-HURT, N., Trachoma. **British Medical Journal**, 323, 218–321, 2001.

MABEY, D.; PEELING, R.W., Lymphogranuloma venereum. **Sexually Transmitted Infections**. 78, 90–92, 2002.

MADELEINE, M.; ANTTILA, T.; SCHWARTZ, S.; et al. Risk of cervical cancer associated with *Chlamydia trachomatis* antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. **International Journal of Cancer**, 120(3):650–655, 2007

MACHADO, A.C.S.; BANDEA, C.I.; ALVES, M.F.C.; JOSEPH, K.; IGIETSEME, J.; MIRANDA, A.E.; GUIMARÃES, E.M. B.; TURCHI, M.D.; BLACK, C.M., Distribution of *Chlamydia trachomatis* genovars among youths and adults in Brazil, **Journal of Medical Microbiology**, 60 (472-476), 2011.

MACHADO, M. S. C.; SILVA, B.F.B.C.; GOMES, I.L.C.; SANTANA, I.U.; GRASSI, M. F. R. Prevalence of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active adolescents from Salvador, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 188-191, 2012.

MAGALHÃES, P.A.F.; MIRANDA, C.A.N.; LIMA, E.G.; MOIZÉIS, R.N.C.; LIMA, D.B.S.; COBUCCI, R.N.O.; FERNANDES, T.A.A.M.; AZEVEDO, J.C.V.; AZEVEDO, P.R.M.; ARAÚJO, J.M.G.; FERNANDES, J.V.F. Genital tract infection with *Chlamydia trachomatis* in women attended at a cervical cancer screening program in Northeastern from Brazil. **Arch Gynecol Obstet. General Gynecology**, 2014, Oct 19.

MALHOTRA, MEENAKSHI; SOOD, SEEMA ; MUKHERJEE, ANJAN ; MURALIDHAR, SUMATHI ; BALA, MANJU . Genital *Chlamydia trachomatis*: An Update, **Indian Journal Medes**. 138(3): 303–316, 2013.

MANIA-PRAMANIK, J.; KERKAR, S.; SONAWANE, S.; MEHTA, P.; SALVI, V.; Current *Chlamydia trachomatis* Infection, A Major Cause of Infertility, **Journal of Reproduction and Infertility**, Vol 13, No 4, 2012.



MARKLE, W.; CONTI, T.; KAD, M. Sexually Transmitted Diseases, **Primary Care: Clinics in Office Practice** 40, 557–587, 2013.

MASCELLINO, M.T.; BOCCIA, P.; OLIVA, A. Immunopathogenesis in *Chlamydia trachomatis* Infected Women, Review Article, **ISRN Obstetrics and Gynecology**, 2011.

MEJUTO, P.; BOGA, J. A.; JUNQUERA, M.; TORREBLANCA, A; LEIVA, P. S. Genotyping *Chlamydia trachomatis* strains among men who have sex with men from a Northern Spain region: a cohort study, **BMJ Open**, 3:002330, 2013.

MOLLER, J.K.; PEDERSEN, L.N.; PERSSON, K. Comparison of the Abbott Real Time CT new formulation assay with two other commercial assays for detection of wild-type and new variant strains of *Chlamydia trachomatis*. **Journal of Clinical and Microbiology**, 48: 440–443, 2010.

MOLANO, M.; MEIJER, C. J. L. M; WEIDERPASS, E.; ARSLAN, A. ; POSSO, H.; FRANCESCHI, S.; RONDEROS, M.; MUÑOZ, N. ; BRULE; A. J. C. V. The Natural Course of *Chlamydia trachomatis* Infection in Asymptomatic Colombian Women: A 5-Year Follow-Up Study. **The Journal of Infectious Diseases**, V. 191, Issue 6, Pp. 907-916, 2005.

MPIGA, P. & RAVAOARINORO, M.; *Chlamydia trachomatis* persistence: An update, **Microbiological Research** 161 9—19 (2006).

MUSHANSKI, L.M.; BRAND, K.; COFFIN, N.; LEVETT, P.N.; HORSMAN, G.B.; RANK, E.L. Comparison of the BD Viper System with XTR Technology to the Gen-Probe APTIMA COMBO 2 Assay using the TIGRIS DTS system for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, **Sexually Transmitted Disease**. 39(7):514-7, 2012.

NAKASHIMA, K; SHIGEHARA, K; KAWAGUCHI, S; WAKATSUKI, A; KOBORI, Y; NAKASHIMA, K; ISHII, Y; SHIMAMURA, M; SASAGAWA, T; KITAGAWA, Y; MIZOKAMI, A; NAMIKI, M. Prevalence of *human papillomavirus* infection in the oropharynx and urine among sexually active men: a comparative study of infection by papillomavirus and other organisms, including *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp., and *Ureaplasma* spp. **BMC Infectious Diseases**. 27;14:43. 2014.

NEWMAN, L; STIRZAKER, S; KNUCKEY, D; ROBINSON, K; HOOD, J; KNOPE, K; FITZSIMMONS, G; MARTIN, N; SIRIPOL, S; GAJANAYAKE, I; KACZMAREK, M; BARR, I; HUI, A; FOXWELL, R; OWEN, R; WRIGHT, P; FITZSIMMONS, G; SANDERS, L; BARRY, C; BARKER, S; ORMOND, J; LIU, C. Australia's notifiable disease status, 2008: annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. **Commun Dis Intell**, 34:157–224. 2010.

OLIVEIRA, L.H.S.; FERREIRA, M.D.P.L.; AUGUSTO, E.F.; MELGAÇO, F.G.; SANTOS, L.S.; CAVALCANTI, S.M.B.; ROSA, M.L.G., *Human papillomavirus* genotypes in

asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 43(1):4-8, 2010.

OLIVEIRA, M.L.; AMORIM, M.M.R.; SOUZA, A.S.R.; ALBUQUERQUE, L.C.B.; COSTA, A.A.R. Infecção Por *Chlamydia* em pacientes com e sem Lesões Intra-Epiteliais cervicais, artigo original **Revista da Associação Médica Brasileira**, 54(6): 506-12, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), Global Strategy For The Prevention And Control Of Sexually Transmitted Infections: 2006–2015, breaking the chain of transmission, Library Cataloguing-in-Publication Data, ISBN 978 92 4 156347 5 (NLM classification: WC 142) 2007.

O'CONNELL, C. M.; IONOVA, I. A.; QUAYLE, A. J.; VISINTIN, A.; INGALLS, R. R., "Localization of TLR2 and MyD88 to *Chlamydia trachomatis* inclusions: evidence for signaling by intracellular TLR2 during infection with an obligate intracellular pathogen," **Journal of Biological Chemistry**, vol. 281, no. 3, pp. 1652–1659, 2006.

OCCHIONERO, M.; PANICCIA, L.; PEDERSEN, D.; ROSSI, G.; MAZZUCCHINI, H.; ENTROCASSI, A.; GALLO VAULET, L.; GUALTIERI, V.; RODRÍGUEZ FERMEPIN, M. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection and factors with the risk of acquiring sexually transmitted infections in college students. **Revista Argentina de Microbiología**. 0325-7541; 2015.

ÖZÜBERK, O.; GÖKAHMETOĞLU, S.; ÖZÇELİK, B.; EKMEKÇİOĞLU, O. Investigation of *Chlamydia trachomatis* with Cell Culture, DFA and PCR Methods in the Genital Swab Samples of Symptomatic Patients, **Mikrobiyoloji Bülteni**; 47(1): 79-86, 2013.

PAAVONEN, J.; WESTROM, L.; ESCHENBACH, D.A.; Pelvic inflammatory disease. In: Holmes, K. K.; Sparling, P.F.; Stamm, W.E., et al., eds. Sexually transmitted diseases. **New York: McGraw Hill Medical** 1017–1050, 2008.

PAAVONEN, J., *Chlamydia trachomatis* in acute salpingitis. **American Journal of Obstetrics & Gynecology** Dec 1;138(7 Pt 2):957-9, 1980.

PETROVAY, F.; BALLA, E.; METH, I.; NCZO, E. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* from the cervical specimens of high-risk women in Hungary. **Journal of Medical Microbiology** 58, 760–764, 2009.

PIÑEIRO, L.; M. MILAGROSA; GIL-SETAS A.; CAMINO, X.; ECHEVERRIA, J.A.; CILLA, G. Genotipado de *Chlamydia trachomatis* en un área del norte de España, **Enfermedads Infecciosas Y Microbiología Clínica**, 2009;27(8):462–464

PINTO, V.; SZWARCOWALD, C.; BARONI, C.; STRINGARI, L.; INOCÊNCIO, L.; MIRANDA, A. *Chlamydia trachomatis* prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. **Sexually Transmitted Disease**. 38:957–61, 2011.

POIARES, L.A.; SANDRINI, F.; OSÓRIO, P.S.; LARGURA, A.; SIMÃO, R.C.G. Validation of a *Chlamydia trachomatis* detection method by Real Time Polymerase Chain Reaction, **Role-based access control**, vol. 40(3): 229-232, 2008.

QUINT, K. D.; BOM, R.J.M.; QUINT, W.G.V.; BRUISTEN, S.M.; LOEFF, M. F.S.; MORRÉ, S.; VRIES, H.J.C., Anal infections with concomitant *Chlamydia trachomatis* genotypes among men who have sex with men in Amsterdam, the Netherlands, Quint et al. **BMC Infectious Diseases**, 11:63, 2011.

RAKE, G.W., Family II. *Chlamydiaceae* Rake, Fam. Nov. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7<sup>a</sup> ed. In: Breed R.S., Murray EGD & Smith N.R., p. 957. **The Williams & Wilkins Co**, Baltimore, 1957.

REILLY, L.A.; FAVACHO, J.; GARCEZ, L.M.; COURTENAY, O. Preliminary evidence that synanthropic flies contribute to the transmission of trachoma- causing *Chlamydia trachomatis* in Latin America. **Cadernos de Saúde Pública**. vol.23, n.7, pp. 1682-1688, 2007.

ROBUFFO, I.; FAZII, P.; RULLI, A.; DI NICOLA, M.; TONIATO, E.; DI RIENZO, M.; COSENTINO, L.; GAMBI, A.; CASTELLANI, M.L.; MARTINOTTI, S. Upgraded diagnostic value of Gen-Probe PACE 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* infection. **Journal of Biological Regulators & Homeostatic Agents**. 22(4):253-61, 2008.

ROCKEY, D.D. Unraveling the basic biology and clinical significance of the chlamydial plasmid. **The Journal of Experimental Medicine** 208: 2159–2162. 2011.

SEADI, C.F., ORAVEC R.; POSER, B.V.; CANTARELLI, V.V.; ROSSETTI, M.L., Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 38(2): 125-133, 2002.

SEHNEM, L.; BODANESE, L.C.; REPETTO, G.; STAUB, H.L. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerotic disease, Review, **Article Scientia Medica**, volume 20, número 3, p. 250-256, Porto Alegre, 2010.

SETH-SMITH, H. M. B.; HARRIS, S. R.; PERSSON, K.; MARSH, P.; BARRON, A.; BIGNELL, A.; BJARTLING, C.; CLARK, L.; CUTCLIFFE, L. T.; LAMBDEN, P. R.; LENNARD, N.; LOCKEY, S. J.; QUAIL, M. A.; SALIM, O.; SKILTON, R. J.; WANG, Y.; HOLLAND, M. J.; PARKHILL, J.; THWHOON, N. R.; CLARKE, I. N . Co-evolution of genomes and plasmids within *Chlamydia trachomatis* and the emergence in Sweden of a new variant strain. **BMC Genomics**. v. 10, p. 1 - 10, 2009.

SILVA, J.V.A.V. caracterização molecular de agentes infecciosos associados ao desenvolvimento de cancro do colo do útero em jovens no norte de Portugal: Estudo do

papilomavírus humano e *Chlamydia trachomatis*, dissertação de mestrado, mestrado em epidemiologia, **Universidade Fernando Pessoa**, Porto, 2011.

STEPHENS, R.S.; MYERS, G.; EPPINGER, M.; BAVOIL, P.M., Divergence without divergence: phylogenetics and taxonomy of *Chlamydia* resolved, Minireview USA, **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 55, 115–119, 2009.

STEPHENS, R.S.; POTERALSKI, J.M.; OLINGER, L. Interaction of *Chlamydia trachomatis* with mammalian cells is independent of host cell surface heparan sulfate glycosaminoglycans. **Infection and Immunity** 74:1795–1799, 2006.

STEPHENS, R.S.; SANCHEZ-PESCADOR, R.; WAGER, E.; INOUE, C.; URDEA, M., Diversity of the major outer membrane proteins of *Chlamydial trachomatis*. **Journal of Bacteriology** 169:3879–3885, 1987.

STEPHENS, R.S.; KOSHIYAMA, K.; LEWIS, E.; KUBO, A. Heparin-binding outer membrane protein of Chlamydiae. **Molecular Microbiology**. 40, 691–699, 2001.

STEPHENS, R. S. “The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis,” **Trends in Microbiology**, vol. 11, no. 1, pp. 44–51, 2003.

SCHOLES, D.S. Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical *Chlamydia* infection. **New England Journal of Medicine**, 334:1362–66, 1996.

SCHOLES, D.; SATTERWHITE, C.L.; ONCHEE, Y.; FINE, D.; WEINSTOCK, H.; BERMAN, S. Long-term trends in *Chlamydia trachomatis* infections and related outcomes in a US managed care population. **Sexually Transmitted Disease**. 39:81–8, 2012.

TRAVASSOS, A.G.A.; BRITES, C.; NETTO, E.M.; FERNANDES, S.A.; RUTHERFORD, G.W.; QUEIROZ, C.M. Prevalence of sexually transmitted infections among HIV-infected women in Brazil, Braz j Infect Dis. **The Brazilian Journal of infectious diseases**, 16(6):581–585, 2012.

SANDOZ, K.M.; ERIKSEN, S.G.; JEFFREY, B.M.; SUCHLAND, R.J.; PUTMAN, T.E.; HRUBY, D.E.; JORDAN, R.t; ROCKEY, D.D. Resistance to a Novel Antichlamydial Compound Is Mediated through Mutations in *Chlamydia trachomatis* secY, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 4296–4302 V. 56 n. 8, August 2012.

STAMM, W.E.; GUINAN, M.E.; JOHNSON, C.; STARCHER, T.; HOLMES, K.K.; MCCORMACK, W.M. Effect of treatment regimens for *Neisseria gonorrhoeae* on simultaneous infection with *Chlamydia trachomatis*. **New England Journal of Medicine** 310(9):545–549, 1984.

STEPHENS, R. S., "The cellular paradigm of chlamydial pathogenesis," **Trends in Microbiology**, vol. 11, no. 1, pp. 44–51, 2003.

SCHOLES, D.; STERGACHIS, A.; HEIDRICH, F.; ANDRILLA, H.; HOLMES, K.; STAMM, W. Prevention of Pelvic Inflammatory Disease By Screening For Cervical Chlamydial Infection. **New England Journal of Medicine**, 334: 1362-1366, 1996.

SILVA, L.C.; MIRANDA, A.E.; BATALHA, R.S.; SABINO, C.C.; DIB, E.; COSTA, C.M.; RAMASAWMY, R.; TALHARI, S. *Chlamydia trachomatis* infection among HIV-infected women attending an AIDS clinic in the city of Manaus, Brazil. *The Brazilian Journal of infectious diseases*, 16(4):335-338, 2012.

TAVARES, M.C.M.; MACÊDO, J.L.; LIMA JÚNIOR, S.F.; HERÁCLIO, S.A.; AMORIM, M.M.; MAIA, M.M.D.; SOUZA, P.R.E. *Chlamydia trachomatis* infection and human papillomavirus in women with cervical neoplasia in Pernambuco-Brazil. *Mol Biol Rep.* 41:865–874, 2014.

TIWARI, V.; MAUS, E.; SIGAR, I. M. ; KYLE, H. R.; SHUKLA, D. Role of heparan sulfate in sexually transmitted infections Published online Jul 6, 2012. **Glycobiology**. Nov, 22(11): 1402–1412 2012.

NEWHALL, J.W. et al. Head-to-head evaluation of five *Chlamydia* tests relative to a quality-assured culture standard. **Journal of Clinical and Microbiology**., 37(3): 681-5, 1999.

UR-REHMAN, T.; SLEPENKIN, A.; CHU, H.; BLOMGREN, A.; DAHLGREN, M. K; ZETTERSTRÖM, C.E.; PETERSON, E.M.; ELOFSSON, M; GYLFE, A.; Pre-clinical pharmacokinetics and anti-chlamydial activity of salicylidene acylhydrazide inhibitors of bacterial type III secretion, **The Journal of Antibiotics**, 65, 397–404, 2012.

UGBOMA, H.A.A.;, NWAGWU VO, JEREMIAH I. Genital *Chlamydia trachomatis* infection among female undergraduate students of University of Port Harcourt, Nigeria Nigerian Medical Journal., 55 (1), 9-13, 2014.

VAN DOMMELEN, L.; VAN TIEL, F.H.; OUBURG, S.; Brouwers, E.E.; Terporten, P.H.; et al. Alarmingly poor performance in *Chlamydia trachomatis* point-of-care testing. **Sexually Transmitted Infections** 86: 355–359, 2010.

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

WANG, S. P. & GRAYSTON, J. T.. Human serology in *Chlamydia trachomatis* infection with microimmunofluorescence. **Journal of Infectious Diseases**, 130:388-397, 1974.

WANG, Y.; CUTCLIFFE, L.T.; SKILTON, R.J.; PERSSON, K.; BJARTLING, C.; CLARKE, I.N. Transformation of a plasmid-free, genital tract isolate of *Chlamydia trachomatis* with a plasmid vector carrying a deletion in CDS6 revealed that this gene

regulates inclusion phenotype. short communication. **Pathogens and Disease**, 67, 100–103, 2013.

WESTROM, L.; JOESOEF, R.; REYNOLDS, G.; HAGDU, A.; Thompson SE. Pelvic inflammatory disease and fertility: a cohort study of 1,844 women with laparoscopically verified disease and 657 control women with normal laparoscopic results. **Sexually Transmitted Disease**, 19:185-92, 1992.

WITKIN, S. S.; LINHARES, I; GIRALDO, P.; JEREMIAS, J.; LEDGER, W.J., Individual Immunity and susceptibility to female genital tract infection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, n. 1, p. 252-256, 2000.

WILSON, J.S.; HONEY, E.; TEMPLETON, A.; PAAVONEN, J.; MARDH, P.A.; STRAY-PEDERSEN B; EU Biomed Concerted Action Group. A systematic review of the prevalence of *Chlamydia trachomatis* among Europe women. **Human Reproduction Update**, Jul-Aug; 8(4):385-94, 2002.

WIRA, C. R. et al. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. **Immunological Reviews**. 206 , 306 – 335, 2005.

WYRICK, P.B., Intracellular survival by *Chlamydia*. **Cellular Microbiology** 2, 275–282, 2000.

YANG, C.; LI, S.; CHANG, S.; WU, P.; LIAO, M.; LIU, W.; WU, H.; WU, C.; SUN, H.; HUNG, C. Associated factors with and genotypes of *Chlamydia trachomatis* infection among clients seeking voluntary counseling and testing for HIV infection in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. 47, 526-532. 2014.

ZIGANGIROVA, N.A.; RUMYANTSEVA, Y.P.; MORGUNOVA, E.Y.; KAPOTINA, L. N.; DIDENKO, L.V.; KOST, E.A.; KOROLEVA, E.A.; BASHMAKOV, Y.K.; PETYAEV, I.M. Detection of *C. trachomatis* in the Serum of the Patients with Urogenital Chlamydiosis, Research Article, Hindawi Publishing, **Corporation BioMed Research International**, 2013.

## **APÊNDICES**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
 LABORATÓRIO DE CITOPATOLOGIA  
 PROJETO DE EXTENSÃO: PREVENÇÃO DO CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

LÂMINA: \_\_\_\_\_

DATA DA

COLETA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

COLETADORA: \_\_\_\_\_

DATA DA

ENTREGA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**1- PERFIL SOCIOECONÔMICO**

NOME: \_\_\_\_\_ TELEFONE-  
 \_\_\_\_\_

ENDEREÇO: \_\_\_\_\_ EMAIL  
 \_\_\_\_\_

ESTADO CIVIL: \_\_\_\_\_ IDADE: \_\_\_\_\_ ANOS

PROFISSÃO/OCUPAÇÃO: \_\_\_\_\_

**ESCOLARIDADE:** ( ) ANALFABETA ( ) ENSINO FUNDAMENTAL: ( ) COMPLETO ( ) INCOMPLETO /  
**ENSINO MÉDIO:**

( ) COMPLETO ( ) INCOMPLETO

**ENSINO SUPERIOR:** ( ) COMPLETO ( ) INCOMPLETO

**EDUCAÇÃO BÁSICA:** ( ) ESCOLA PÚBLICA ( ) ESCOLA PARTICULAR

**CURSO:** \_\_\_\_\_ **RENDA FAMILIAR:** \_\_\_\_\_ **PESO:** \_\_\_\_\_ Kg

**2- DADOS DA ANAMINESE**

**Fumante:** ( ) Sim ( ) Não **Consome bebida alcoólica?** ( ) Sempre ( ) Ocasionalmente ( )  
 Nunca

**Data da primeira menstruação:** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Data da última menstruação:**

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_



**Idade da primeira menstruação:** \_\_\_\_\_ anos      **Menstruação é regular?** ( ) Sim ( )

Não

**Nº de parceiros DESDE o início da vida sexual:** \_\_\_\_\_

**Início da vida sexual:** \_\_\_\_\_ anos      **Nº de parceiros sexuais no ÚLTIMO ANO:**

\_\_\_\_\_

**Usa preservativo frequentemente em todas as relações sexuais?** ( ) Sim ( ) Não

**Possui parceiro fixo?** ( ) Sim ( ) Não

**Possui vida sexual atualmente?** ( ) Sim

( ) Não

**Qual método contraceptivo você utiliza:** ( ) Preservativo ( ) DIU ( ) Pílula ( ) Outro (

) Não usa

**Aborto:** ( ) Sim ( ) Não

**Possui filhos?** ( ) Sim ( ) Não

**Quantos?** \_\_\_\_\_

**Nº de partos**

**normais:** \_\_\_\_\_

**Idade do primeiro parto** \_\_\_\_\_

**Quantos?** \_\_\_\_\_

**Higiene íntima: Interna** ( ) Sim ( ) Não

**Externa** ( ) Sim ( ) Não

**Terapia de reposição hormonal:** ( ) Sim ( ) Não      **Período:** \_\_\_\_\_

**Apresentou algum problema ginecológico?** (Corrimento, Sangramento, Dores, Ardência ao urinar ou outros)

( ) Sim ( ) Não

**Qual?** \_\_\_\_\_

**Faz exame preventivo ginecológico anualmente?** ( ) Sim ( ) Não ( ) Primeira coleta

**Em que ano fez o último exame preventivo?** \_\_\_\_\_ **onde fez?**

\_\_\_\_\_

**Qual foi o resultado?** \_\_\_\_\_

**Possui histórico de casos de câncer na Família** ( ) Sim ( ) Não

**Faz uso de algum medicamento, (inclusive antibiótico)?** ( ) Sim ( ) Não

**Qual?** \_\_\_\_\_

**Fez alguma cirurgia?** ( ) Sim ( ) Não

**Qual órgão?** \_\_\_\_\_

( ) Cauterização      ( ) Biópsia      ( ) Radioterapia

**Toma remédio para verme:** ( ) Sim ( ) Não

**Última vez que tomou (mês ou ano):** \_\_\_\_\_ **Faz uso da segunda dose?**

( ) Sim ( ) Não

### Queixas sintomatológicas

**Apresenta algum sintoma ginecológico?** ( ) Sim ( ) Não

**Qual?** ( ) Corrimento      **Cor:** \_\_\_\_\_

( ) Sangramentos ( ) Dores ( ) Odor ( ) Prurido/coceira ( ) Ardência ao Urinar

### ASPECTOS DO COLO DO ÚTERO

( ) HIPEREMIADO

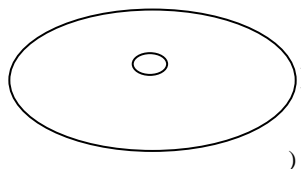
\_\_\_\_\_

(

\_\_\_\_\_

(

\_\_\_\_\_



OUTROS:

FERIDO

\_\_\_\_\_

ECTOPIA

\_\_\_\_\_

**APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Projeto: Prevalência e Variabilidade Genotípica de *Chlamydia Trachomatis* em amostras cervical em estudantes de universidade Pública em Belém, Pará, Brasil**

Senhora \_\_\_\_\_

Solicitamos sua participação voluntariamente nesta pesquisa que tem como objetivo investigar Infecções sexualmente transmissíveis em mulheres que já iniciaram sua vida sexual. Caso você aceite participar, serão coletados dois espécimes cervicais (amostras do colo do útero), um para o exame de biologia molecular (verificação de moléculas) e outro para exame citológico (observação das condições das células do colo do útero). Serão tomados todos os cuidados necessários para que a coleta seja o menos incômoda possível, pois esta será realizada por profissional capacitado, que não comentará em hipótese alguma condições da amostra bem como da quem se submeter ao exame.

Seus resultados serão tratados de forma anônima e confidencial, isto é, em nenhum momento serão divulgados seus dados em qualquer fase do estudo. Quando for necessário exemplificar determinada situação, sua privacidade será assegurada uma vez que seu nome será substituído de forma aleatória. Os dados coletados serão utilizados apenas nesta pesquisa e os resultados divulgados em eventos e/ou revistas científicas.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder as perguntas a serem realizadas sob a forma de questionário. E a doação de material biológico (secreção cérvico-vaginal). Não haverá nenhum custo ou quaisquer compensações financeiras, nem riscos de qualquer natureza relacionada a sua participação. O benefício direto relacionado à sua participação será a obtenção dos resultados dos exames, além do beneficiamento à comunidade científica através dos resultados da pesquisa.

Fica claro que o sujeito da pesquisa, ou o seu representante legal, pode a qualquer momento retirar seu consentimento, não tendo nenhum tipo de ônus ou pagamento, e que sua desistência em nada compromete o seu atendimento junto aos serviços oferecidos pela equipe do projeto.

---

Leonardo Miranda dos Santos (Pesquisador responsável)

Consentimento:

Declaro que li e compreendi as informações sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido sobre o conteúdo da mesma, assim como os seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante

---

Ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical - Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92, Umarizal -  
fone: (91)3201-6812. CEP: 66055240

**ANEXOS**



NÚCLEO DE MEDICINA  
TROPICAL-NMT/  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



**PROJETO DE PESQUISA**

**Título:** Detecção de *Chlamydia trachomatis* em estudantes universitárias atendidas no laboratório de Citopatologia/ UFPA: análise citológica e molecular.

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 07574012.3.0000.5172

**Pesquisador:** MAISA SILVA DE SOUSA

**Instituição:** Núcleo de Medicina Tropical-NMT/ Universidade Federal do Pará - UFPA

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**Número do Parecer:** 103.571

**Data da Relatoria:** 21/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

O projeto está apresentado de maneira adequada, contendo todos os itens exigidos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos estão claros.

**Objetivo Primário:**

Estimar a frequência de infecção por *Chlamydia trachomatis* em estudantes universitárias que realizam o exame preventivo de câncer de colo do útero no laboratório de Citopatologia/ UFPA.

**Objetivo Secundário:**

a. Comparar resultados entre as técnicas de biologia molecular e citologia.

b. Relacionar achados citológicos e inflamatórios com os casos de infecção por *Chlamydia trachomatis*.

c. Identificar um perfil comportamental das estudantes, em relação à prevenção de infecções sexualmente transmissíveis.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos e benefícios estão descritos no projeto de maneira adequada.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta relevância científica.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos obrigatórios constam no projeto.

**Recomendações:**

Nenhum

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto deve ser aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado acata o parecer do relator.

BELEM, 21 de Setembro de 2012

*Hellen Thais Fuzii*  
Coordenadora do Comitê de Ética

Assinado por:  
Hellen Thais Fuzii

Endereço: Av. Generalíssimo Deodoro, 92  
Bairro: Umarizal  
UF: PA Município: BELEM  
Telefone: (91)3201-6857

CEP: 68.055-240

E-mail: cepbel@ufpa.br