

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE
PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

FERNANDA ALVES DE BRITO E CARDOSO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR *Chlamydia trachomatis* E *Neisseria gonorrhoeae*: AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO SWAB VAGINAL

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Fátima Costa Alves

Dissertação de Mestrado

Goiânia-GO

2010

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS (TEDE) NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

Autor (a):	Fernanda Alves de Brito e Cardoso		
E-mail:	nandainnet@hotmail.com		
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	
Vínculo empregatício do autor	Não		
Agência de fomento:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Sigla:	CNPQ
País:	Brasil	UF: GO	CNPJ:
Título:	Diagnóstico molecular das infecções por <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i> : avaliação do desempenho do swab vaginal		
Palavras-chave:	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , PCR, desempenho, urina, swab endocervical, swab vaginal		
Título em outra língua:	Molecular diagnosis of <i>Chlamydia trachomatis</i> and <i>Neisseria gonorrhoeae</i> infections: evaluation of vaginal swab performance		
Palavras-chave em outra língua:	<i>C. trachomatis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i> , prevalence, urine, endocervical swab, vaginal swab, PCR, performance		
Área de concentração:	Imunologia		
Data defesa: (dd/mm/aaaa)	14/12/2010		
Programa de Pós-Graduação:	Medicina Tropical e Saúde Pública		
Orientador (a):	Maria de Fátima Costa Alves		
E-mail:	fc-alves@hotmail.com		
Co-orientador(a):*	Marília Dalva Turchi		
E-mail:	mturchi@iptsp.ufg.br		

*Necessita do CPF quando não constar no SisPG

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF ou DOC da tese ou dissertação.

O sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor (a)

Data: ____ / ____ / ____

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

FERNANDA ALVES DE BRITO E CARDOSO

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR *Chlamydia trachomatis* E *Neisseria gonorrhoeae*: AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DO SWAB VAGINAL

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Fátima Costa Alves

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical, área de concentração Imunologia.

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro do Ministério da Saúde – Coordenação Nacional de DST/AIDS – UNESCO, com apoio da Secretaria Municipal de Saúde de Inhumas, Goiás.

Goiânia-GO

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

C268d Cardoso, Fernanda Alves de Brito e.
Diagnóstico molecular das infecções por *Chlamydia trachomatis* e
Neisseria gonorrhoeae [manuscrito]: avaliação do desempenho do swab
vaginal / Fernanda Alves de Brito e Cardoso. - 2010.

106 f. : il.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de Fátima Costa Alves.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2010.

Bibliografia.

Inclui listas de abreviaturas e tabelas.

1. DST - *Chlamydia trachomatis* - *Neisseria gonorrhoeae*. 2. DST
– urina – exame. 3. Teste de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT's).
4. Swab endocervical. 5. Swab vaginal. I. Título.

CDU: 616.97

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Aluno (a): Fernanda Alves de Brito e Cardoso

Orientador (a): Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Alves

Co-orientador (a): Profa.Dra. Marília Dalva Turchi

Membros:

1. Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Alves

2. Profa. Dra. Marília Dalva Turchi

3. Profa. Dra. Rosane Ribeiro Figueiredo Alves

Data: 14/12/2010

Aos meus pais, Celso e Mércia, por todo o amor e apoio incondicional, pelo exemplo de pessoas que são e que admiro. Todas as minhas vitórias eu devo a vocês. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida e por todas as bênçãos.

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Alves, por ser uma ótima pessoa, pelo bom convívio, pelos ensinamentos, conselhos e por permitir que esta jornada fosse menos árdua.

Aos meus irmãos, Frederico e Fellipe, pelo companheirismo, paciência e por todo o auxílio para a realização deste trabalho.

Ao Glauber, por todo o amor e carinho, por acreditar em mim, por me acalmar nos dias mais estressantes e por me fazer muito feliz.

Aos meus tios, tias, primos e primas: Eunice, Paulo, Jersseni, Vinícius, Yuri, Lara, Luna, por toda a torcida, pelo interesse em minha vida e por sempre desejarem o meu sucesso.

À Profa. Dra. Eleuse Machado de Britto Guimarães pela contribuição em todas as etapas de desenvolvimento deste projeto, pelo exemplo de disposição para o trabalho e generosidade.

À Profa. Dra. Marília Dalva Turchi, por sua ajuda indispensável na realização deste trabalho, por todas as pertinentes contribuições e sugestões no exame de qualificação.

Às Profas. Dras. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer e Megmar Carneiro pela simpatia e pelas contribuições para o melhor desenvolvimento desta dissertação.

As minhas amigas Yanna Andressa Ramos de Lima e Nígela Rodrigues Carvalho por terem sido fundamentais para esta minha nova conquista. Muito obrigada pelas infundáveis ajudas, por todo o carinho e paciência a mim dispensados.

À Mônica da Guarda pelo auxílio na coleta das amostras, por solucionar os problemas mais estressantes do laboratório e pelo bom convívio.

A toda equipe do projeto “Adolescer com Saúde” de Inhumas que trabalhou arduamente para o sucesso deste projeto, que participaram de forma ativa no recrutamento e entrevista das adolescentes e na coleta das amostras biológicas.

Às Profas. Adriana e Lucimeire, à Ana Cláudia e Ângela pelo apoio e ótimo convívio no laboratório, por serem pessoas boas e sempre dispostas a ajudar.

Aos meus amigos e amigas, Marina, Rodrigo Londe, Régis, Nilson, Elisa, Mirelle, Viviane, Júlia, Liliane, Ludmylla, Rodrigo Oliveira, Ludimila, Marcela, que torcem por mim e que acreditam no meu sucesso.

Aos amigos da imunologia, Bruna, Bruna Daniela, Aline, Ludimila, Lucas, Keila, Regiane, Rodrigo, pelos bons momentos, pelo acolhimento e por toda ajuda e torcida.

Muito obrigada a todos vocês!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos.....	1
1.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>.....	3
1.2.1 Biologia.....	3
1.2.2 Ciclo evolutivo.....	4
1.2.3 Imunidade, mecanismos de evasão e persistência.....	5
1.3 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>.....	8
1.3.1 Biologia e fatores de virulência.....	8
1.3.2 Ciclo evolutivo.....	11
1.3.3 Imunidade e mecanismos de evasão.....	14
1.4 Diagnóstico.....	17
1.4.1 Cultura.....	18
1.4.2 Bacterioscopia.....	19
1.4.3 Testes de detecção de antígenos.....	19
1.4.4 Testes de hibridização de ácidos nucléicos.....	20
1.4.5 Testes de amplificação de ácidos nucléicos (NAATs).....	21
1.5 Utilização do swab vaginal nos NAATs.....	23
2 JUSTIFICATIVA.....	33

3 OBJETIVOS.....	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Considerações éticas.....	35
4.2 População de estudo.....	36
4.3 Entrevista.....	37
4.4 Coleta das amostras e transporte.....	38
4.5 Diagnóstico laboratorial.....	39
4.5.1 Processamento das amostras.....	39
4.5.2 Amplificação dos DNAs alvos de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>.....	40
4.5.3 Detecção dos DNAs alvos amplificados.....	41
4.6 Processamento e análise dos dados.....	42
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Características sócio-demográficas e de comportamento sexual da população estudada.....	44
5.2 Prevalência das infecções por <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i>.....	47
5.3 Avaliação do desempenho da PCR na detecção de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> empregando urina, swabs endocervical e vaginal.....	49
5.4 Análise de concordância de resultados entre as três amostras biológicas analisadas.....	52
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS.....	85

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética.....	85
ANEXO B- Termo de Consentimento Informado nº1.....	86
ANEXO C - Termo de Consentimento Informado nº2.....	87
ANEXO D- Questionário nº1.....	88
ANEXO E- Artigo publicado.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação do desempenho das amostras genitais femininas na pesquisa da <i>C. trachomatis</i> e da <i>N. gonorrhoeae</i> pelos diferentes tipos de NAATs.....	25
Tabela 2	Comparação de NAATs na pesquisa da <i>C. trachomatis</i> empregando diferentes tipos de amostras biológicas.....	29
Tabela 3	Comparação de NAATs na pesquisa da <i>N. gonorrhoeae</i> empregando diferentes tipos de amostras biológicas.....	31
Tabela 4	Características sócio-demográficas de 428 adolescentes e jovens sexualmente ativas recrutadas nos postos do PSF do município de Inhumas, Goiás.....	45
Tabela 5	Características do comportamento sexual de 428 adolescentes e jovens recrutadas nos postos do PSF do município de Inhumas, Goiás.....	46
Tabela 6	Percentual de participantes que não coletaram os três tipos de amostras biológicas (N=119).....	47
Tabela 7	Percentual de positividade das infecções por <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> nos três tipos de amostras biológicas analisadas (N=309).....	49
Tabela 8	Desempenho da PCR no diagnóstico de <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> empregando as amostras de urina, swabs endocervical e vaginal (N=309).....	51
Tabela 9	Concordância de resultados entre as três amostras biológicas analisadas na detecção das infecções por <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> (N=309).....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ACS	Agente Comunitário de Saúde
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASGP-R	Receptor asialoglicoproteína
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
CEACAMs	Membros de uma família de antígenos carcinoembrionários
CI	Controle interno
CO₂	Dióxido de carbono
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
DCs	Células dendríticas
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
DIP	Doença inflamatória pélvica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade ótica
Dp	Desvio padrão
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
dUTP	Deoxiuridina trifosfato
E	Especificidade
EIA	Ensaio imunoenzimático
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos macrófagos

β-HCG	Gonadotrofina coriônica humana
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSPG	Proteoglicanas sulfato de heparana
IFD	Imunofluorescência direta
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
Kda	Kilodalton
LGV	Linfogranuloma venéreo
LHr	Receptor lutropina
LOS	Lipooligossacarídeo
LSP	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MOMP	Proteína principal da membrana externa
MS	Ministério da Saúde
NAATs	Testes de amplificação de ácidos nucleicos
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
Opa	Proteína associada a opacidade
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMNs	Polimorfonucleares
PSF	Programa de Saúde da Família
RMP	Proteína modificável por redução

S	Sensibilidade
SE	Swab endocervical
SM	Salário mínimo
SV (AC)	Swab vaginal auto-coletado
SV (CC)	Swab vaginal coletado pelo clínico
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Fator de crescimento transformador- β
TMB	3,3',5,5' - Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
U	Urina
UFG	Universidade Federal de Goiás
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

RESUMO

Introdução: A introdução dos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) foi um grande avanço no rastreamento das doenças sexualmente transmissíveis (DST) causadas por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, pois apresentam alta sensibilidade e permitem a utilização de amostras de coleta não invasiva, como a urina. O uso da urina facilitou o diagnóstico em indivíduos assintomáticos e possibilitou a realização de estudos epidemiológicos em locais fora do ambiente clínico. Vários estudos mostram que o swab vaginal também pode ser utilizado na detecção de ambas as infecções, porém a *Food and Drug Administration* restringe o seu uso apenas pelo NAAT Aptima Combo 2. No Brasil, o NAAT mais utilizado no diagnóstico de clamídia e neisseria é o kit Amplicor CT/NG (Roche) e, até o momento, nenhum estudo avaliou a utilização do swab vaginal. **Objetivos:** Avaliar o desempenho do kit AMPLICOR CT/NG (Roche) no diagnóstico de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* empregando urina, swabs endocervical e vaginal e analisar a concordância de resultados entre as diferentes amostras biológicas. **Métodos:** A população alvo foi constituída de adolescentes e jovens sexualmente ativas, com idade entre 15 e 24 anos, residentes em Inhumas, Goiás. Os dados sócio-demográficos e de comportamento sexual foram obtidos através de entrevista. O diagnóstico foi realizado empregando o kit Amplicor CT/NG (Roche) em amostras de urina, swab endocervical (SE) e swab vaginal (SV). Para avaliação do desempenho foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo dos testes. O coeficiente kappa foi calculado para avaliar a concordância entre as amostras. Considerou-se um resultado como verdadeiro-positivo quando pelo menos duas das três amostras biológicas da mesma paciente fossem positivas para clamídia e/ou gonococo. **Resultados:** Entre as 428 participantes a média de idade foi de 19,4 anos. Os três espécimes biológicos foram coletados de 309 adolescentes (72,2%). Entre estas, as prevalências foram de 8,7% (IC95% 5,8-12,4) para *C. trachomatis* e de 2,3% (IC95% 0,9-4,6) para *N. gonorrhoeae*. Para clamídia as sensibilidades observadas com as diferentes amostras foram superiores a 80% e as especificidades superiores a 97%, com valores preditivos positivos (VPPs) entre 78,8% e 84,6% e valores preditivos negativos (VPNs) >98%. Para o gonococo as sensibilidades foram de 42,8% na urina, 71,4% no SE e de 100% no SV com especificidades >96% nas três amostras. Os dois tipos de swab apresentaram baixos VPPs para o gonococo ($\approx 40\%$) e a urina apresentou VPP de 100%. Os VPNs foram >98%. A concordância de resultados da PCR empregando as diferentes amostras foi de cerca de 94% para ambas as infecções. Entretanto, os valores do coeficiente kappa (κ) variaram de 0,68 a 0,73 para clamídia, o que significa concordância substancial entre as amostras. Para a infecção gonocócica, a concordância foi fraca ou razoável com valores de κ variando de 0,13 a 0,33. **Conclusões:** Os desempenhos das amostras e os valores do κ sugerem que o swab vaginal parece ser equivalente à urina e ao swab endocervical na detecção da clamídia podendo ser recomendado para estudos de triagem. As três amostras diferiram quanto ao desempenho na detecção da infecção gonocócica e não apresentaram boa concordância de resultados sugerindo que não são equivalentes no diagnóstico desta infecção com o kit de PCR utilizado.

Palavras-chave: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, PCR, desempenho, urina, swab endocervical, swab vaginal.

ABSTRACT

Background: The introduction of the nucleic acid amplification tests (NAATs) was a major breakthrough in the screening for the sexually transmitted diseases (STD) caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* because they are highly sensitive and they can be used with noninvasive specimens, such as urine. The use of urine has made it far easier to test asymptomatic individuals and has also made it possible to perform epidemiological studies in places other than clinical settings. Many studies have shown also that vaginal swab can be used for detection of both infections, however, just the NAAT Aptima Combo 2 has been cleared by *Food and Drug Administration* for this specimen use. In Brazil, the most widely used NAAT for the diagnosis of chlamydia and neisseria is the kit Amplicor CT/NG (Roche) and, up to date, there isn't any study which evaluates the use of vaginal swabs. **Objectives:** To evaluate the performance of the kit AMPLICOR CT/NG (Roche) in the diagnosis of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* using urine, endocervical and vaginal swabs and to analyze the agreement of results between the different biological specimens. **Methods:** The target population was sexually active adolescents and young women between 15 and 24 years from Inhumas, Goiás. Socio-demographic and sexual behavior were obtained through a face-to-face interview. The diagnosis was performed by PCR using the AMPLICOR CT/NG (Roche) assay in urine, vaginal swab (VS) and endocervical swab (ES) specimens. For the performance evaluation were calculated the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value. The kappa coefficient was calculated to assess agreement between the samples. It was considered a true-positive result when at least two of three biological samples from the same patient were positive for chlamydia and/or gonococcus. **Results:** Among the 428 participants the mean age was 19,4 years. The three biological specimens were collected from 309 adolescents (72.2%). Among these, the prevalence rates were 8.7% (IC95% 5,8-12,4) for *C. trachomatis* and 2.3% (IC95% 0,9-4,6) for *N. gonorrhoeae*. For chlamydia the sensitivities observed with the different samples were above 80% and specificities exceeding 97% with positive predictive values (PPV) between 78.8% and 84.6% and negative predictive values (VPNs) >98%. For the gonococcus the sensitivities were 42.8% for urine, 71.4% for ES and 100% for VS with specificities >96% for the three samples. The two types of swab showed low PPVs for gonococcus (~40%) and urine showed PPV of 100%. VPns were >98%. The agreement of results between specimens was around 94% for the detection of both infections. However, the values of kappa (κ) coefficient ranged from 0.68 to 0.73 for chlamydia, which means substantial agreement between samples. For gonococcal infection, the agreement was slight or fair with κ coefficients ranging from 0.13 to 0.33. **Conclusions:** The performances of the specimens and the κ values suggest that the vaginal swab appears to be equivalent to urine and endocervical swab for detection of chlamydia and may be suitable for screening studies. The three samples showed different performance in the detection of gonococcus and did not present good agreement of results, suggesting that they are not equivalent in the diagnosis of this infection with the PCR kit used.

Key-words: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, prevalence, urine, endocervical swab, vaginal swab, PCR, performance.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e epidemiológicos

A *Chlamydia trachomatis* e a *Neisseria gonorrhoeae* são responsáveis pelas doenças sexualmente transmissíveis (DST) bacterianas mais comuns em todo o mundo. Segundo a última estimativa global feita pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ocorrem anualmente cerca de 154 milhões de novos casos de infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (OMS 2001). Estas DST são consideradas graves problemas de saúde pública, pois apresentam as mais altas taxas de prevalência entre adolescentes e jovens com idade inferior a 25 anos, principalmente do sexo feminino (Risser et al. 2005) e pelo grande potencial de provocarem morbidades que afetam irreversivelmente o sistema reprodutivo (Hoebe et al. 2006). A evolução de ambas as infecções em mulheres não tratadas pode levar a doença inflamatória pélvica (DIP), caracterizada pelo comprometimento das trompas de falópio que pode culminar em graves seqüelas, como dor pélvica crônica, gravidez ectópica e infertilidade (Donovan 2004). Outra importante característica destas DST é a ausência de sintomas, aproximadamente 70% e 50% dos casos de infecções clamidial e gonocócica em mulheres são assintomáticas, o que dificulta o diagnóstico e tratamento precoces (Hoebe et al. 2006).

Os adolescentes e jovens estão sob maior risco de adquirirem alguma DST, pois freqüentemente têm relações sexuais sem proteção, envolvem-se em relacionamentos de curta duração com diferentes parceiros sexuais e raramente procuram os serviços de saúde (CDC 2006). Estes comportamentos são preocupantes, pois embora a maioria das DST tenha um início benigno, elas podem levar a graves seqüelas ao longo do tempo, como infertilidade e câncer cervical, além de poderem contribuir para o aumento do risco de aquisição da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Forhan et al. 2009).

Além destes fatores comportamentais característicos dos adolescentes e jovens, as mulheres apresentam maior vulnerabilidade para a aquisição de DST devido a fatores biológicos. Na adolescência, o colo uterino pós menarca é caracterizado pela presença de ectopia onde o epitélio colunar da endocérvice se estende para a ectocérvice (junção escamocolunar) tornando-se mais exposto, condição que favorece a infecção por vários

microrganismos causadores de DST, incluindo a clamídia e o gonococo. Além disso, a variação hormonal durante o ciclo menstrual influencia a concentração de imunoglobulinas G (IgG) e o número de células de defesa tornando a mucosa genital feminina mais vulnerável a diversas infecções (Sonnex et al. 1998, Risser et al. 2001).

Em 2007, aproximadamente 1 milhão de casos da infecção clamidial e cerca de 355 mil casos da infecção gonocócica foram notificados pelos 50 estados americanos ao *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC). O maior número de casos foi observado entre adolescentes e jovens do sexo feminino com idade entre 15 e 24 anos, sendo evidenciadas taxas de mais de 5900 casos da infecção clamidial e mais de 1200 casos da infecção gonocócica por 100.000 habitantes (CDC 2009a,b). No Canadá, entre os anos de 1997 e 2007 foi observado um aumento de 466,6 para 871,6 casos da infecção clamidial e de 49,2 a 114,7 casos da infecção gonocócica por 100.000 habitantes entre os indivíduos com idade inferior a 25 anos. No mesmo período, foi também evidenciado um aumento considerável no número de casos destas infecções na população adulta, principalmente com idade entre 40 e 59 anos (Fang et al. 2010).

No Brasil, as infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* não são de notificação compulsória o que dificulta a mensuração desses agravos. Em 1999, o Ministério da Saúde recomendou o rastreamento de casos de DST assintomáticos, especialmente sífilis, gonorréia e clamídia em gestantes e adolescentes (MS 1999). Entretanto, o rastreamento das infecções clamidial e gonocócica continua não sendo realizado e as únicas DST que fazem parte da lista nacional de doenças de notificação compulsória são a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), a infecção pelo HIV em gestantes e crianças, a sífilis em gestantes e a sífilis congênita (MS 2008).

Esta ausência de rastreamento e notificação da maioria das DST impede o conhecimento do real perfil epidemiológico destas doenças no país. De acordo com a última estimativa feita pelo Ministério da Saúde em 2003, ocorrem anualmente cerca de 2 milhões de novos casos da infecção clamidial e aproximadamente 1,5 milhões da infecção gonocócica no Brasil (PN-DST/AIDS 2003). Entretanto, não há cálculo oficial da prevalência desses agravos e tampouco dos custos gerados ao Sistema Único de Saúde (SUS) por estas infecções e suas complicações.

Em pesquisas realizadas em diferentes regiões do Brasil, como nas cidades de Vitória, Goiânia, Salvador e Campinas, foram observadas prevalências das infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* que variaram de 12,2% a 17,6% e de 1,9% a 3,2%, respectivamente, em população de adolescentes e jovens sexualmente ativas com idade

inferior a 30 anos (Miranda et al. 2004, Araújo et al. 2006, Codes et al. 2006, Fernandes et al. 2009). Em um estudo planejado pelo Ministério da Saúde e realizado em seis capitais brasileiras (Manaus, Fortaleza, Goiânia, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre) foram observadas prevalências das infecções por clamídia e neisseria de 9,4% e 1,5%, respectivamente, em uma população de 3303 gestantes com média de idade de 23,8 anos (Jalil et al. 2008). Os estudos citados confirmam que no Brasil a população feminina jovem também é um importante grupo de risco para estas infecções.

Como uma forma de prevenir as complicações destas DST é através do rastreamento, o CDC preconiza que todas as adolescentes e jovens do sexo feminino, sexualmente ativas, com idade menor ou igual a 25 anos sejam rastreadas anualmente para as infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. O rastreamento também é recomendado para mulheres com mais de 25 anos que apresentem comportamento de risco, como ter novo ou múltiplos parceiros sexuais, ter relação com parceiro sintomático ou fazer uso inconsistente de preservativo. O CDC recomenda, ainda, o rastreamento da infecção gonocócica em adolescentes com antecedentes de infecção prévia, infecção por outras DST, usuários de drogas ou profissionais do sexo (CDC 2006).

1.2 *Chlamydia trachomatis*

1.2.1 Biologia

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria Gram negativa, intracelular obrigatória, pertencente à família *Chlamydiaceae* e ao gênero *Chlamydia*, no qual estão também incluídas as espécies denominadas *C. muridarum* e *C. suis* que infectam ratos e suínos, respectivamente (Mpiga & Ravaoarinoro 2006). A *C. trachomatis* possui um complexo protéico em sua membrana externa composto por três proteínas: duas proteínas ricas em cisteína (OmcA e OmcB) e uma proteína principal de membrana externa denominada MOMP (do inglês, *major outer membrane protein*) (Sun et al. 2007). Com base nas variações antigênicas presentes na MOMP foram identificadas 19 sorovariedades de *C. trachomatis* (Brunham & Rey-Ladino 2005, Spaargaren et al. 2005).

As sorovariedades A, B, Ba e C infectam o epitélio da conjuntiva e podem levar ao tracoma (Brunham & Rey-Ladino 2005), uma doença caracterizada pelo desvio da margem palpebral que induz o crescimento dos cílios em direção ao globo ocular provocando uma irritação permanente da conjuntiva bulbar e da córnea podendo resultar em cegueira (Peeling et al. 2006). As sorovariedades D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja e K estão associadas às infecções do trato urogenital como cervicites, uretrites, endometrites e quando persistentes podem levar à doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade e gravidez ectópica. Estas sorovariedades causam também infecções perinatais caracterizadas pela conjuntivite neonatal e pneumonia nos recém-nascidos (Brunham & Rey-Ladino 2005). Os tipos L1, L2a, L2b e L3 causam o linfogranuloma venéreo (LGV) uma doença mais invasiva do que aquelas causadas pelas sorovariedades D-K. O LGV pode se manifestar como uma síndrome inguinal caracterizada por ulcerações genitais e linfadenopatia inguinal (bubões) ou como uma síndrome anogenitoretal com proctocolite e hiperplasia intestinal e do tecido linfático periretal (Spaargaren et al. 2005).

1.2.2 Ciclo evolutivo

Todas as sorovariedades de *C. trachomatis* podem infectar uma grande variedade de células eucarióticas, mas só se replicam em células epiteliais. Geralmente infectam células epiteliais da conjuntiva ocular e células do epitélio simples colunar presentes na endocérvice das mulheres e na uretra dos homens (Brunham & Rey-Ladino 2005, Peeling et al. 2006). Nestes locais a bactéria inicia seu ciclo de vida bifásico no qual se apresenta sob duas formas: uma extracelular denominada corpo elementar e a outra forma intracelular chamada de corpo reticulado (Mpiga & Ravaoarino 2006).

Os corpos elementares são partículas circulares que variam de 0,2 a 0,6 μm de diâmetro, osmoticamente estáveis e metabolicamente inativos com função de penetrar a célula hospedeira (Mpiga & Ravaoarino 2006). O receptor específico ao qual o corpo elementar se liga na célula permanece ainda indefinido devido às diferenças biológicas existentes entre as sorovariedades de *Chlamydia* que interferem nesta interação. Além disso, a *C. trachomatis* possivelmente utiliza diferentes receptores e mecanismos para invadir a célula (Dautry-Varsat et al. 2005). Alguns estudos sugerem que a interação inicial ocorra através da ligação reversível com glicosaminoglicanas semelhantes ao

sulfato de heparana presentes na superfície celular, entretanto, este mecanismo não ocorre em todas as sorovariades (Zhang & Stephens 1992, Davis & Wyrick 1997).

Uma vez no interior da célula os corpos elementares continuam seu ciclo em um vacúolo denominado inclusão clamidial. Este vacúolo não se funde aos lisossomos celulares devido à capacidade da bactéria modificar as características da membrana de inclusão tornando-a uma vesícula não-lisossomal e pela síntese de proteínas que impedem a fusão (Scidmore et al. 1996). Os corpos elementares permanecem dentro da inclusão clamidial sem sofrer a ação das enzimas lisossomais e após várias transformações se diferenciam em corpos reticulados.

Os corpos reticulados têm diâmetro que varia de 0,6 a 1,5 μm , são metabolicamente ativos e se dividem por fissão binária aumentando o número de células bacterianas (Mpiga & Ravaoarino 2006). Neste estágio a *C. trachomatis* é capaz de inibir o processo de apoptose da célula infectada com o intuito de aumentar sua sobrevivência no meio intracelular, através da secreção de proteases, que clivam proteínas do hospedeiro responsáveis pela indução da apoptose (Fischer et al. 2004). Após aproximadamente 18 horas os corpos reticulados se diferenciam novamente em corpos elementares que serão expelidos da célula hospedeira. Neste momento, a *C. trachomatis* pode induzir a apoptose celular estimulando a secreção de citocinas como o TNF- α ou ativando proteínas pró-apoptóticas (Jendro et al. 2004, Miyairi & Byrne 2006). Em 48-72 horas pós-infecção os corpos elementares ganham o meio extracelular para penetrarem em novas células iniciando assim novo ciclo biológico (Mpiga & Ravaoarino 2006).

1.2.3 Imunidade, mecanismos de evasão e persistência

No local da infecção ocorre intensa atividade inflamatória que é caracterizada por vermelhidão e edema da mucosa e em alguns casos, corrimento vaginal nas mulheres e uretral nos homens (Brunham & Rey-Ladino 2005). A inflamação decorre inicialmente da ativação da imunidade inata do hospedeiro na tentativa de eliminar o microrganismo. A ativação da resposta imune ocorre devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células epiteliais no momento em que ocorre a penetração clamidial, como interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (Roan & Starnbach

2008). Estas células podem também secretar IL-8 que recruta células da imunidade inata que incluem células natural killer (NK), neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs), abundantes na mucosa genital (Buchholz & Stephens 2006). O recrutamento celular induz aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , e pode levar à restrição do crescimento da *C. trachomatis* no interior da célula infectada.

Outra citocina produzida pelas células da imunidade inata capaz de limitar o crescimento bacteriano é o interferon- γ (IFN- γ) que atua em macrófagos aumentando sua capacidade fagocítica e bactericida contra os corpos elementares extracelulares, induzindo maior produção de óxido nítrico pela célula infectada (Roan & Starnbach 2008), além de reduzir a expressão do receptor de transferrina na superfície celular, diminuindo assim a fonte de ferro, elemento importante para o crescimento da *C. trachomatis* (Freidank et al. 2001).

Embora a imunidade inata forneça a primeira linha de defesa contra a replicação bacteriana, é necessária a ativação de células da imunidade adaptativa, que incluem os linfócito T e B, para limitar a infecção e promover proteção durante re-infecções futuras com *C. trachomatis*. Estas células são recrutadas de linfonodos regionais próximos, como os ílacos, pois a mucosa genital não possui estrutura linfóide organizada como as placas de Peyer observadas no intestino. Durante a infecção, as células imunes migram para o trato genital em resposta às quimiocinas que são secretadas pelas células epiteliais infectadas. Isso resulta na formação de um aglomerado de linfócitos e outras células imunes, onde os linfócitos T e B específicos para os antígenos clamidiais serão selecionados e expandidos (Brunham & Rey-Ladino 2005, Roan & Starnbach 2008).

A importância das células T no controle da infecção clamidial foi evidenciada há mais de 20 anos por Rank et al. (1985) que mostraram que camundongos atímicos, deficientes de células T, estabeleciam infecção crônica enquanto camundongos normais eliminavam o patógeno em aproximadamente 20 dias. Em 1991, Ramsey e Rank observaram a participação coordenada dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ na eliminação da *C. trachomatis*. Estas células reconhecem, respectivamente, antígenos clamidiais extracelulares fagocitados e intracelulares, oriundos da replicação bacteriana. Os autores demonstraram que a transferência de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ específicos para antígenos clamidiais para camundongos atímicos resultava em eliminação da infecção. Entretanto, a transferência de apenas uma das linhagens de células T mostrou que linfócitos TCD8⁺ conferiam proteção em apenas alguns animais enquanto os linfócitos TCD4⁺ eram muito mais eficientes.

As células TCD4⁺ ativadas são importantes produtoras de citocinas com papel efetor na resposta imune. A diferenciação desta célula nos subtipos Th1 ou Th2 depende da natureza da infecção e dos tipos de citocinas produzidas durante a resposta inflamatória. A presença da *C. trachomatis* no organismo induz resposta imune mediada pelo subtipo Th1 produtor de IFN- γ , citocina que fortalece a resposta mediada pelas células da imunidade inata, além de intensificar a resposta imune adaptativa induzindo maior apresentação de antígenos para LTCD4⁺ e LTCD8⁺, através do aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As células Th1 também promovem a ativação de células TCD8⁺ e linfócitos B (Morrison et al. 2000, Loomis & Starnbach 2002). Os linfócitos TCD8⁺ podem atuar tanto secretando mais IFN- γ como induzindo a lise das células infectadas por *C. trachomatis* (Loomis & Starnbach 2002).

O sinergismo entre células Th1 e linfócitos B na defesa contra *C. trachomatis* foi sugerido por Morrison et al. em 2000. O estudo mostrou que camundongos deficientes de células B eram ligeiramente mais susceptíveis a infecção secundária por *C. trachomatis*, entretanto, quando estes camundongos tinham suas células TCD4⁺ depletadas tornavam-se incapazes de eliminar o patógeno. Os linfócitos B reconhecem e neutralizam antígenos clamidiais solúveis e são importantes na resposta imune em re-infecções (Brunham & Rey-Ladino 2005). O estudo de Sakthivel et al. (2008) mostrou que a citocina CCL5 induz maior resposta Th1 e aumenta a produção de anticorpo IgG2a e IgA. Uma maior concentração de IgA nas secreções cervicais de mulheres infectadas está relacionada com redução no número de *C. trachomatis* infectantes (Brunham & Rey-Ladino 2005).

Apesar da habilidade do sistema imune em detectar e responder à infecção, a *C. trachomatis* é capaz de evadir à resposta imune e persistir no hospedeiro. Estudos *in vitro* mostram que a bactéria pode induzir menor expressão de moléculas do MHC pelas células infectadas podendo limitar o seu reconhecimento pelo sistema imune (Zhong et al. 1999, 2000). É também capaz de induzir ou inibir os processos apoptóticos da célula o que permite que a *C. trachomatis* permaneça por mais tempo no meio intracelular para completar seu ciclo sem que seja notada pelo sistema imune (Perfettini et al. 2000, Pirbhai et al. 2006, Roan & Starnbach 2008). *In vivo*, a evasão ao sistema imune é evidenciada de forma indireta uma vez que a bactéria não induz uma forte resposta imune contra re-infecções, possivelmente devido ao fato de que a *C. trachomatis* induz

uma resposta imune efetora inadequada e sem o desenvolvimento de memória imunológica (Brunham & Rey-Ladino 2005).

A persistência da clamídia e re-infecções subseqüentes podem levar às patologias associadas à infecção por induzir um quadro de inflamação crônica. Igietseme et al. (2009) sugeriram que as respostas imunes mediadas por linfócitos TCD4⁺ e, principalmente por TCD8⁺, estão também envolvidas na patogênese das seqüelas induzidas por *C. trachomatis*. O estudo mostrou que camundongos *knockout* para células TCD8⁺ tinham aproximadamente 70% de sua fertilidade reduzida enquanto camundongos *knockout* para linfócitos TCD4⁺, mas com células TCD8⁺ eficientes, se tornavam 100% inférteis quando eram repetidamente infectados pelo patógeno. Além disso, a indução da forma persistente aumenta a expressão da proteína de choque térmico de 60 KDa (hsp-60) produzida pela *C. trachomatis*, que compartilha cerca de 50% de homologia com a hsp-60 humana, podendo induzir auto-imunidade contra a hsp-60 do hospedeiro. Existem evidências de que a imunidade contra a hsp-60 clamidial contribui substancialmente para a oclusão tubária e para adversidades durante a gravidez (Witkin 2002, Mpiiga & Ravaoarinoro 2006).

1.3 *Neisseria gonorrhoeae*

1.3.1 Biologia e fatores de virulência

A *Neisseria gonorrhoeae* é um coco Gram negativo encontrado aos pares em amostras biológicas sendo descrito como um diplococo. É um microrganismo que cresce bem em temperatura de 33 a 35°C e em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. Pertence à família *Neisseriaceae* e ao gênero *Neisseria* juntamente com *N. meningitidis*, outro importante patógeno humano. Ao contrário desta, a *N. gonorrhoeae* não apresenta cápsula polissacarídica. Uma importante característica da *N. gonorrhoeae* é o acentuado grau de variação entre os isolados que se deve às mutações genéticas, à capacidade da bactéria absorver DNA do meio externo e à troca de material genético através de conjugação com outras espécies de *Neisseria*. Uma grave consequência destas variações é o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (Peeling et al. 2006).

A *N. gonorrhoeae* infecta o epitélio do trato urogenital incluindo a uretra masculina, a endocérvice uterina e as trompas de falópio causando a DST conhecida como gonorréia (Edwards & Apicella 2004). O período de incubação desta doença varia de 2 a 5 dias e a transmissibilidade pode durar de meses a anos caso o paciente não seja tratado (MS 2008). Têm sido também relatadas infecções da conjuntiva, faringe e mucosa retal, além de invasão da corrente sanguínea causando infecção disseminada. Os diferentes sítios de infecção podem levar a um vasto espectro de manifestações clínicas (Edwards & Apicella 2004).

No homem, a infecção é normalmente sintomática e o sintoma mais precoce é o prurido intra-uretral com disúria, evoluindo para corrimento inicialmente mucóide que posteriormente se torna purulento e abundante. Se não houver tratamento, ou se esse for tardio ou inadequado, o processo se propaga por toda a uretra e também pode acometer outras áreas como prepúcio (balanopostite), epidídimo (epididimite), próstata (prostatite) e testículos (orquite), inclusive com comprometimento da fertilidade (MS 2008). Para persistir na uretra masculina evitando que seja eliminada pela urina, *N. gonorrhoeae* tem desenvolvido eficientes métodos de aderência às células epiteliais, podendo ser também encontrada intracelularmente em leucócitos polimorfonucleares (PMNs) atraídos para o local da infecção, no interior dos quais pode inclusive se replicar (Simons et al. 2005).

A infecção em mulheres é na maioria dos casos assintomática, mas quando aparente, manifesta-se sob a forma de cervicite, com disúria, além de ser observada secreção cervical mucóide ou purulenta (MS 2008). Os recém-nascidos de mães doentes ou portadoras da infecção podem apresentar doença aguda que se manifesta de 2 a 5 dias após o nascimento. As mais graves manifestações clínicas são conjuntivite neonatal, sepsis, incluindo artrite e meningite (CDC 2006). Os sintomas da infecção retal em homens e mulheres, quando presentes, podem incluir corrimento, prurido anal, dor, sangramento, evacuações dolorosas. A infecção da faringe geralmente é assintomática, mas pode causar dor de garganta (CDC 2007).

O mecanismo de infecção do gonococo envolve a participação de vários fatores de virulência que permitem que a bactéria se adapte com sucesso a microambientes variáveis do mesmo hospedeiro (Edwards & Apicella 2004). Entre estes fatores está o pilus, uma adesina que possui papel crítico no ataque inicial à célula hospedeira (Swanson 1973). Em algumas células, a proteína do sistema complemento CD46, um co-fator de membrana expresso nas células nucleadas, serve como um receptor ao pilus

promovendo maior adesão bacteriana que resulta no rápido fluxo de cálcio oriundo das reservas intracelulares para o citoplasma (Kallstrom et al. 1997, 1998, 2001). O pilus exerce também um importante papel no rearranjo do citoesqueleto celular (Merz & So 1997). Estes dados sugerem que o pilus modula os mecanismos de sinalização da célula hospedeira para promover a invasão do epitélio pelo gonococo (Edwards & Apicella 2004). Além disso, através de sua habilidade de contrair-se, o pilus promove motilidade dos gonococos tornando-os capazes de colonizar e ascender nas superfícies mucosas (Wall & Kaiser 1999).

As proteínas de membrana externa associadas a opacidade, denominadas Opa (proteína II), atuam também na íntima associação entre a *N. gonorrhoeae* e a célula hospedeira (Griffiss et al. 1999). O microrganismo é capaz de expressar 11 diferentes tipos de proteínas Opa (Opa50 a Opa60) (Kupsch et al. 1993, Bos et al. 1998), mas apenas um tipo em cada bactéria pode contribuir para o tropismo celular exibido pelo gonococo (Makino et al. 1991). A proteína Opa₅₀ se liga a proteoglicanas sulfato de heparana (HSPG) celulares e as proteínas Opa51 a Opa60 reconhecem antígenos carcinoembrionários, membros de uma família de moléculas de adesão celular (CEACAMs ou CD66), expressos diferentemente em vários tipos celulares (Bos et al. 1998, Naumann et al. 1999). Estas proteínas modulam o rearranjo do citoesqueleto necessário para a endocitose de gonococos associados às células ativando diferentes proteínas quinases (Grassmé et al. 1997, Hauck et al. 1998).

A proteína Opa₅₂ permite a interação do microrganismo com células fagocitárias através de sua ligação ao CD66 em neutrófilos humanos (Virji et al. 1996, Gray-Owen et al. 1997). Hauck et al. (1998) sugeriram que a fagocitose de *N. gonorrhoeae* mediada por esta interação pode facilitar a acomodação e sobrevivência da bactéria no interior dos fagócitos, uma etapa essencial durante o curso da infecção. Williams et al. (1998) observaram que no meio intracelular as proteínas Opa podem também aumentar a sobrevivência do microrganismo seqüestrando a enzima piruvatoquinase da célula como um meio de adquirir o piruvato, que é necessário para a viabilidade gonocócica.

A membrana externa da *N. gonorrhoeae* possui grande quantidade de lipooligossacarídeos (LOS). O LOS difere do lipopolissacarídeo (LPS), encontrado na maioria das bactérias Gram negativas, pela ausência do antígeno O que compõe a cadeia polissacarídica do LPS (Preston et al. 1996). Durante o crescimento do gonococo *in vitro*, ocorrem variações fenotípicas na expressão de epítomos oligossacarídeos no LOS entre microrganismos de uma mesma cepa ou de cepas diferentes. A observação dessa

variação antigênica entre os membros de um mesmo clone demonstra que a composição das cadeias de LOS pode variar em um mesmo microrganismo (Apicella et al. 1987). A conversão espontânea destes determinantes pode mudar o modo de associação ao tecido do hospedeiro e possivelmente alterar o curso da infecção (Edwards & Apicella 2004).

Outro fator de virulência são as porinas (proteína I) que têm importante papel no mecanismo patogênico da *N. gonorrhoeae*, controlando, por exemplo, a sobrevivência da célula hospedeira. Müller et al. (1999) observaram que as porinas podem induzir a apoptose de células epiteliais e fagocíticas *in vitro*. Durante a infecção, as porinas presentes na membrana externa da bactéria migram para a membrana da célula hospedeira e induzem um rápido influxo de cálcio para o citosol resultando na ativação de calpaínas e caspases que são responsáveis por iniciar os mecanismos de morte celular. As porinas podem também modular a maturação dos fagossomos dos PMNs alterando a expressão de proteínas (Mosleh et al. 1998), além de inibir a desgranulação dos grânulos primários e secundários e a expressão de receptores para a porção Fc de IgG e para componentes do complemento, alterando assim a ação bactericida dos PMNs (Bjerknes et al. 1995).

A *N. gonorrhoeae* expressa também em sua membrana externa a proteína III ou Rmp (proteína modificável por redução) que é conservada e está fisicamente associada às porinas e ao LOS. Esta proteína exerce proteção contra a ação bactericida do soro humano por induzir a produção de IgG bloqueadoras que competem com anticorpos bactericidas contra o LOS e as porinas, devido à proximidade física entre estas estruturas, e desta forma impede a ativação efetiva do sistema complemento (Rice et al. 1986, Plummer et al. 1993).

1.3.2 Ciclo evolutivo

O conhecimento sobre o ciclo evolutivo e a patogênese da infecção por *N. gonorrhoeae* é dificultada pela falta de um modelo animal experimental que simule a infecção em qualquer local do corpo humano. Para estudar a infecção, os pesquisadores recorrem à utilização de culturas de órgãos, de tecidos e de células imortalizadas, à análise de biópsias clínicas, além da participação de voluntários humanos para estudar a infecção uretral em homens. Porém, a utilização desses modelos experimentais não explica a infecção humana como um todo e está sujeita a diferentes interpretações

(Edwards & Apicella 2004). Soma-se a isso a heterogeneidade da população gonocócica que expressa variantes antigênicas dos constituintes superficiais importantes na infecção, que incluem o pilus, as proteínas Opa e o LOS, possibilitando o reconhecimento de diferentes receptores celulares em locais distintos do organismo humano o que dificulta o entendimento do ciclo biológico do microrganismo e de seus vários mecanismos de infecção (Cohen & Cannon 1999).

De modo geral, a infecção inicia com a adesão do gonococo aos microvilos das células epiteliais não-ciliadas. Nas primeiras horas de infecção, a interação da bactéria com a célula ocorre na forma de microcolônias de 10 a 100 diplococos. Após 6-18 horas, as bactérias se dispersam das microcolônias, perdem o pilus e diplococos individuais tornam-se intimamente associados com a membrana plasmática da célula hospedeira (Nassif et al. 1999, Merz & So 2000). Esta interação com a célula difere entre homens e mulheres.

O sucesso da interação da bactéria com o epitélio uretral masculino requer a participação do pilus, entretanto, o receptor na célula uretral para esta estrutura ainda não foi identificado (Edwards & Apicella 2004). Outro possível mecanismo importante na adesão da bactéria é a sua associação com o receptor asialoglicoproteína (ASGP-R), uma glicoproteína humana de membrana que medeia a endocitose de partículas reconhecendo ligantes com resíduos de galactose. Durante a infecção gonocócica ocorre o tráfico de ASGP-R para a superfície apical da célula uretral. Sugere-se que o ASGP-R se liga ao resíduo terminal de lactose (lacto-N-neotetraose) presente no LOS bacteriano auxiliando a entrada da *N. gonorrhoeae* na célula (Harvey et al. 2001a).

Em mulheres, a análise de biópsias clínicas e o estudo com células epiteliais cervicais humanas indicam que o receptor do complemento CR3 serve como ligante primário para a adesão e invasão da *N. gonorrhoeae* na ectocérvice e endocérvice. Este receptor está presente nas células do epitélio cervical, mas não é encontrado no trato urogenital masculino (Edwards et al. 2001). No início da infecção o componente C3b do complemento se liga ao lipídio A do LOS bacteriano e é rapidamente inativado e convertido em iC3b (Edwards & Apicella 2002). A interação do gonococo ao CR3 requer a participação do componente iC3b aderido à superfície do microrganismo em conjunto com a interação do pilus e das porinas que se ligam ao domínio I de CR3 (Edwards et al. 2002). A sinalização de CR3 resulta em uma cascata de ativação que será responsável pela internalização da bactéria (Edwards et al. 2000, 2001).

Após a adesão bacteriana, ocorre a polimerização de actina com conseqüente rearranjo do citoesqueleto celular que é acompanhado pela extensão dos microvilos que aumenta a região de contato com o microrganismo promovendo sua entrada no polo apical da célula epitelial (Nassif et al. 1999, Merz & So 2000). O destino da *N. gonorrhoeae* no interior da célula é incerto. Alguns autores mostram que o microrganismo é encontrado no interior de vacúolos (Harvey et al. 1997, Lin et al. 1997), mas Apicella et al. (1996) evidenciaram a sua presença também no citosol. Outros estudos mostraram que a bactéria pode reduzir os níveis de muitos constituintes lisossomais para aumentar a sua sobrevivência no meio intracelular (Lin et al. 1997, Ayala et al. 1998). No epitélio cervical, a internalização do gonococo via CR3 possivelmente aumenta a sobrevivência bacteriana por inibir a sinalização celular e a explosão respiratória, uma vez que, moléculas que se ligam ao domínio I de CR3 não induzem resposta inflamatória nas células (Berton et al. 1992, Edwards et al. 2001).

Existem evidências de que a bactéria pode se replicar no meio intracelular. Simons et al. (2005), em estudo realizado com PMNs, observaram que o microrganismo penetra nestas células e induz explosão respiratória que é responsável pela eliminação de parte dos gonococos. Porém, alguns microrganismos resistem à ação bactericida dos PMNs e conseguem se replicar. Isso foi evidenciado pelo aumento considerável no número de bactérias viáveis no interior da célula após seis horas de infecção.

Após 40 horas de infecção a *N. gonorrhoeae* deixa a célula e chega ao estroma tecidual subepitelial (Nassif et al. 1999, Merz & So 2000). Esta transição ocorre pela transcitose da bactéria em direção à superfície baso-lateral da célula e envolve a participação do pilus, sendo que esta movimentação ocorre sem rompimento das barreiras epiteliais (Merz et al. 1996). A *N. gonorrhoeae* é também capaz de controlar a sobrevivência da célula hospedeira através da ação das porinas que induzem apoptose (Müller et al. 1999) ou pela indução da expressão de genes celulares anti-apoptóticos sugerindo que a maior sobrevivência da célula epitelial pode permitir que a bactéria prolifere no meio intracelular e, conseqüentemente promova a colonização gonocócica (Binnicker et al. 2003). Especula-se que a indução da apoptose pelas porinas e os efeitos citotóxicos sejam eventos tardios no curso da infecção que são precedidos por um prolongado tempo de sobrevivência tanto da célula hospedeira como do patógeno (Müller et al. 1999).

Uma vez no espaço subepitelial a *N. gonorrhoeae* induz um processo inflamatório que será responsável pelos sintomas da doença. Embora a bactéria infecte

seletivamente as células não-ciliadas serão as células ciliadas as mais danificadas durante a inflamação. Se a infecção não for tratada, a função dos cílios nestas células pode ser completamente perdida (Stephens et al. 1987). Os danos às células ciliadas se devem principalmente aos efeitos tóxicos de fragmentos solúveis de peptidoglicanos e LOS bacterianos (Gregget al. 1981, Mellyet al.1984). Durante seu crescimento, a *N. gonorrhoeae* induz exteriorização de vesículas celulares contendo LOS e peptidoglicanos. A ligação dos anticorpos a estes antígenos ativa a cascata do complemento com a conseqüente formação do componente C5a que exerce um forte estímulo para o influxo de PMNs para o local da infecção. Estas células potencializam a inflamação com a liberação de metabólitos de oxigênio e proteinases que podem causar morte celular e destruição tecidual (Rice & Schachter 1991, Westrom & Wolner-Hanssen 1993). Soma-se a isso o aumento da concentração de TNF- α que também induzirá dano ao tecido (McGee et al. 1992).

1.3.3 Imunidade e mecanismos de evasão

Uma característica marcante da doença gonocócica sintomática em homens é a presença de uma secreção purulenta que resulta da resposta inflamatória contra o microrganismo. Esta inflamação está associada com a presença de PMNs, descamação de células do epitélio uretral e presença de citocinas que ainda não foram completamente definidas *in vivo* (Harvey et al. 2002). Ramsey et al. (1995) em estudo com modelo experimental humano de infecção gonocócica observaram a presença de IL-6, IL-8 e TNF- α na urina de voluntários do sexo masculino após duas horas da infecção intra-uretral e antes dos primeiros sintomas. Durante este período, os níveis de RNA mensageiro para IL-6, IL-8 e TNF- α em PMNs na urina permaneceram inalterados. Ocorreu um pico de IL-1 β durante os sintomas iniciais. Os achados sugerem que IL-6, IL-8 e TNF- α foram produzidos pelo epitélio uretral, enquanto a IL-1 β foi secretada pelos PMNs presentes no infiltrado inflamatório. O mesmo padrão de citocinas foi obtido por Harvey et al. (2002) após estímulo de células epiteliais uretrais com o gonococo e com LOS.

Sugere-se que a resposta inflamatória à infecção difere em homens e mulheres uma vez que a infecção nas mulheres é em sua maioria assintomática. Além disso, Hedges et al. (1998) não observaram níveis aumentados de IL-1, IL-6 e IL-8 em

secreções genitais de mulheres com cervicite gonocócica como evidenciado em amostras masculinas. O aumento de IL-6 foi observado apenas no plasma (Ramsey et al. 1995). Em contraste, em outro estudo com células epiteliais cervicais e vaginais imortalizadas foi observado o aumento dos níveis destas citocinas (Fichorova et al. 2001). A liberação de citocinas inflamatórias pelo epitélio cervical em resposta a *N. gonorrhoeae* permanece ainda não esclarecida (Edwards & Apicella 2004).

Song et al. (2008) analisaram em um modelo animal com camundongos BALB/c fêmeas a resposta imune humoral contra a infecção gonocócica e observaram que a infecção não induziu resposta substancial de anticorpos evidenciada pelos baixos níveis de IgG, IgM e IgA nos lavados vaginais e/ou no soro. Estes dados são consistentes com os encontrados durante a infecção humana. Vários estudos com pacientes naturalmente infectados observaram a presença de anticorpos contra *N. gonorrhoeae* apenas em algumas das amostras de soro, exsudato uretral, lavado vaginal e secreção cervical analisadas (Cohen 1967, Tramont 1977, McMillan et al. 1979, Ison et al. 1986).

Em relação à imunidade mediada por células, estudos *in vitro* mostram que a protease IgA1 secretada pela *N. gonorrhoeae*, proteína capaz de clivar a IgA1 humana, induz ativação de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, B CD19⁺ e células NK CD56⁺, evidenciada pela expressão do marcador de ativação CD69 nestas células. Ocorre também a produção de IFN- γ pelos linfócitos TCD4⁺, sugerindo que esta protease é uma importante indutora de resposta Th1 (Tsirpouchtsidis et al. 2002).

Foi observado que a *N. gonorrhoeae* induz a produção de IL-17 por células T de camundongos e a produção de citocinas por células apresentadoras de antígenos de camundongos e humanos que induzem a diferenciação de linfócitos Th17, *in vitro*. Anticorpos bloqueadores de IL-17 ou a deleção do receptor de IL-17 em camundongos levaram ao prolongamento da infecção e à redução do fluxo de neutrófilos. Estes resultados estabeleceram um papel crucial da IL-17 e de células Th17 na resposta imune contra o gonococo (Feinen et al. 2010). O linfócito Th17 origina-se pela diferenciação do linfócito TCD4⁺ na presença de TGF- β , IL-6 e IL-23. Foi recentemente descoberto e difere das células Th1 e Th2 por ser produtor de IL-17 e por apresentar diferentes mecanismos efetores. O Th17 é importante na defesa contra patógenos Gram negativos e extracelulares e também está relacionado com algumas doenças autoimunes (Bettelli et al. 2007).

Sugere-se que a resposta imune adaptativa contra o gonococo seja fracamente estimulada e não protetora. Assim, Song et al. (2008) analisaram se infecções repetidas

podiam estabelecer memória imunológica contra *N. gonorrhoeae*. Observaram que camundongos anteriormente infectados apresentavam suscetibilidade similar à re-infecção com a mesma cepa quando comparados aos controles. Infecções repetidas um mês após a infecção inicial não intensificaram o título de anticorpo IgG específico para o gonococo. Os resultados mostram que as re-infecções não geram resposta imune protetora e memória imunológica humoral. Os autores sugerem possíveis explicações para este fato: primeiro, o tecido do trato genital feminino pode ser naturalmente imunodeprimido para acomodar o sêmen e bactérias comensais; segundo, a ausência de um tecido linfóide organizado na mucosa genital para induzir uma resposta imune efetiva; terceiro, a variação hormonal durante o ciclo menstrual pode influenciar a resposta imune contra o gonococo.

De fato, a ascensão da bactéria para o trato genital superior feminino é influenciada pela variação hormonal que altera a expressão de proteínas do sistema complemento, como exemplo, o aumento da produção de C3 pelo epitélio cervical durante a menstruação (Hasty et al. 1994), bem como a expressão de moléculas que servem como receptores para o gonococo no trato genital feminino. Especula-se que o receptor lutropina (LHr) para os hormônios luteinizante e gonadotrofina coriônica humana (hCG) pode atuar como um receptor para o gonococo no epitélio endometrial e das trompas de falópio (Spence et al. 1997).

A expressão do LHr é maior no sentido do endométrio para as trompas, sendo aumentada durante a menstruação. Isso possivelmente explica a maior suscetibilidade das mulheres às complicações relacionadas à infecção e a correlação destas complicações com o período menstrual (Reshef et al. 1990, Spence et al. 1997). O LHr está também presente na uretra, placenta, decídua e membranas do feto (Reshef et al. 1990). Embora a associação gonococo-LHr não esteja ainda confirmada, a ocorrência desta interação na decídua e nas membranas placentárias pode contribuir para o risco aumentado de aborto espontâneo associado com a infecção por *N. gonorrhoeae* (Edwards & Apicella 2004).

Outro importante fator sugerido por Song et al. (2008) para explicar a ausência de resposta imune protetora contra a infecção é a capacidade da bactéria de interferir e evadir à resposta imune do hospedeiro. Por exemplo, cadeias laterais de oligossacarídeos de LOS terminam em epítomos que mimetizam moléculas de açúcar de glicosíngolípídeos de mamíferos. Esta forma de mimetismo molecular permite que a

bactéria escape do sistema imune e utilize moléculas do hospedeiro que normalmente estão associadas à estrutura mimetizada (Harvey et al. 2001b).

Algumas estruturas de LOS podem também servir como moléculas aceptoras da deposição de ácido siálico que é mediada pela sialiltransferase codificada pelo gonococo (Mandrell & Apicella 1993). Este processo confere resistência à ação do soro humano (Parsons et al. 1992, Smith et al. 1995), pois altera as estruturas alvos dos anticorpos no LOS e impede a ativação do sistema complemento inibindo a deposição dos componentes C3 e C9 na superfície da bactéria (van Putten & Robertson 1995). Porém, a presença do ácido siálico no LOS prejudica a entrada da *N. gonorrhoeae* em algumas linhagens celulares, pois possivelmente forma uma cápsula protetora que impede a associação dos componentes bacterianos com seus respectivos receptores na célula hospedeira. Isso sugere que a variação antigênica de LOS permite que o gonococo flutue entre um fenótipo invasivo ou resistente ao soro e isto pode promover a sobrevivência bacteriana *in vivo* (van Putten 1993; van Putten & Robertson 1995).

Pantelic et al. (2005) observaram que *N. gonorrhoeae* é capaz de inibir a produção de anticorpos e induzir a morte de linfócitos B que expressam CEACAM1. A ligação Opa-CEACAM1 ocorre também em linfócito TCD4+ inibindo a ativação desta célula através da supressão da sinalização via receptor da célula T (TCR) dependente de tirosina kinase (Lee et al. 2008).

1.4 Diagnóstico

A Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs a abordagem sindrômica para triagem e tratamento das infecções clamidial, gonocócica e outras DST baseada em um algoritmo de sinais e sintomas que incluem corrimento uretral ou vaginal e presença de úlceras (OMS 2003). Os resultados mostram que esta abordagem aplica-se bem para as DST ulcerativas e para a infecção gonocócica em homens nos quais o corrimento uretral é relativamente específico para gonorréia. Entretanto, para mulheres esta abordagem mostra-se pouco adequada, pois a presença de corrimento vaginal não é um bom marcador para as infecções por *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae*, sendo mais comumente causado por vaginoses bacterianas, candidíase ou infecção por *Trichomonas vaginalis* (OMS 2003, Peeling et al. 2006).

Em um estudo realizado em Goiânia com adolescentes de 15 a 19 anos ficou comprovado que a utilização da abordagem sindrômica não permite a correta identificação de mulheres infectadas por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. Evidenciou-se que a utilização do escore de risco recomendado pela OMS apresentou 31,9% de sensibilidade, 76,5% de especificidade e valor preditivo positivo de 20,8%, indicando que apenas 20,8% das pacientes identificadas pelo score de risco tinham de fato alguma infecção cervical por clamídia ou neisseria. A presença de sintomas como dor abdominal por apalpação, ectopia, friabilidade do colo uterino e corrimento mucopurulento também mostraram baixa sensibilidade na indentificação das infecções clamidial e gonocócica. Isso ocorreu pelo fato de que estas infecções são predominantemente assintomáticas nesta população (Guimarães et al. 2009).

Dessa forma, o uso de testes diagnósticos apropriados é fundamental para detectar eficientemente essas infecções. Vários são os métodos disponíveis para o diagnóstico laboratorial das infecções clamidial e gonocócica e incluem: a cultura, os testes de detecção de antígenos, como ensaios imunoenzimáticos (EIAs) e a imunofluorescência direta (IFD), os testes de detecção por hibridização de ácidos nucléicos e os testes de amplificação de ácidos nucléicos (NAATs). Para o gonococo também pode ser utilizada a pesquisa direta do agente pela bacterioscopia.

1.4.1 Cultura

Durante a década de 80 o desenvolvimento de sistemas de cultura em células tornou viável o diagnóstico de *C. trachomatis* em laboratório a partir de amostras clínicas (Chernesky 2005). Por muitos anos este método diagnóstico foi considerado o padrão ouro na detecção da clamídia por apresentar aproximadamente 100% de especificidade. É o método de escolha para fins médico-legais e para teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por permitir a manutenção da viabilidade dos microrganismos. Porém, não é recomendada para uso em rotina por não apresentar sensibilidade satisfatória que têm mostrado grande variação entre os estudos podendo ser inferior a 50% ou até de 90%, além da complexidade técnica e da demora na obtenção dos resultados (Newhall et al. 1999, Bebear & Barbeyrac 2009).

Diferentemente do que é observado para *C. trachomatis*, a cultura em meios apropriados como o Thayer-Martin ou Ágar chocolate tem alta especificidade (100%) e

sensibilidade (85-95%) para *N. gonorrhoeae* e é considerada o método diagnóstico de referência para este microrganismo. É recomendada para propósitos médico-legais e permite a avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos. Entretanto, tem como desvantagem a necessidade de um prazo de 24 a 72 horas para liberação do resultado (Olshen & Shrier 2005, Bignell et al. 2006, Peeling et al. 2006).

1.4.2 Bacterioscopia

O gonococo pode ser detectado pela bacterioscopia pelo Gram. A sensibilidade e especificidade dessa técnica em amostras uretrais de homens sintomáticos são em torno de 95% e 99%, respectivamente, podendo dessa forma ser usada como método diagnóstico. O uso da bacterioscopia em homens assintomáticos ou em amostras endocervicais, de orofaringe ou retais, apresenta baixa sensibilidade não sendo recomendada nesses casos (CDC 2006). Em mulheres a microscopia detecta apenas aproximadamente 50% das infecções (Peeling et al. 2006).

1.4.3 Testes de detecção de antígenos

Os métodos de cultura de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* apresentam dificuldades associadas com a manutenção da viabilidade dos microrganismos durante o transporte e armazenamento das amostras. Estes fatores incentivaram o desenvolvimento de testes que não requerem organismos viáveis que incluem ensaios imunoenzimáticos (EIAs) e a imunofluorescência direta (IFD) que detectam antígenos específicos clamidial ou gonocócico (CDC 2002).

Tanto os EIAs como a IFD utilizam anticorpos mono ou policlonais marcados que se ligam ao LPS ou MOMP da *C. trachomatis* e geram cor que pode ser visualizada por espectrofotômetro (EIA) ou microscópio de fluorescência (IFD). Comparados a cultura, os EIAs para clamídia possuem sensibilidade que varia de 62-72% e especificidade superior a 99%. Enquanto a sensibilidade e especificidade da IFD comparada a cultura é de 75% e 99%, respectivamente (Newhall et al. 1999). Ambos os testes podem ser utilizados no diagnóstico de amostras endocervical, uretral e da conjuntiva, além de swab retal para IFD (Olshen & Shrier 2005).

Estes testes não apresentam desempenho que os tornem competitivos em relação à cultura no diagnóstico de *N. gonorrhoeae* e não têm sido utilizados como métodos iniciais para a detecção deste agente. Os EIAs são apenas utilizados na detecção do gonococo em casos em que a cultura e os NAATs não estão disponíveis (CDC 2002, Olshen & Shrier 2005).

A vantagem dos EIAs e da IFD em relação à cultura é que não exigem cuidados especiais no transporte e armazenamento das amostras, como refrigeração. A IFD é um teste de realização rápida, porém subjetiva, exige microscopista experiente, não pode ser automatizada e não é indicada para laboratórios que possuem grande fluxo de amostras. Os EIAs são de fácil realização e podem ser automatizados, entretanto, podem gerar resultados falso-positivos para clamídia decorrente da reação cruzada dos anticorpos contra LPS de outros microrganismos, incluindo outras espécies de *Chlamydia spp*, necessitando de repetição em todos os resultados positivos. Sem a confirmação, os EIAs tornam-se menos específicos e não são indicados para a triagem de população com baixa prevalência da infecção clamidial (CDC 2002, Chernesky 2005, Olshen & Shrier 2005, Bebear & Barbeyrac 2009).

1.4.4 Testes de hibridização de ácidos nucléicos

Depois dos testes de detecção de antígeno foram desenvolvidos os testes de hibridização de ácidos nucléicos que detectam DNA ou RNA específicos de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (CDC 2002). Em relação à cultura, a sensibilidade pode variar de 75% a 97,7% na detecção clamidial e de 92-96% no diagnóstico da infecção gonocócica. Na pesquisa de ambos os microrganismos as especificidades são superiores a 98% (Newhall et al. 1999, Schachter et al. 1999, Bignell et al. 2006). Permitem armazenamento de amostras, que incluem swabs uretral, endocervical e da conjuntiva, sem refrigeração por até 7 dias. Não são recomendados para a análise de urina, amostras retal, vaginal e da orofaringe (Olshen & Shrier 2005).

1.4.5 Testes de amplificação de ácidos nucléicos (NAATs)

Na última década foi desenvolvida uma nova geração de testes que amplificam e detectam seqüências específicas de DNA ou RNA de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* e têm sido considerados os métodos mais sensíveis e promissores na identificação destes microrganismos (CDC 2002, Fang et al. 2008). Os NAATs revolucionaram o diagnóstico das infecções clamidial e gonocócica por serem capazes de detectar estes agentes a partir de uma única cópia de DNA ou RNA o que aumenta consideravelmente a sensibilidade destes testes (CDC 2002, Olshen & Shrier 2005). Comparados à cultura, os NAATs mostram sensibilidades que variam de 82,6% a 100% para *C. trachomatis* e de 82,5% a 100% para a *N. gonorrhoeae* e especificidades superiores a 96% para os dois microrganismos (Vincelette et al. 1999, Johnson et al. 2000, Van der Pol et al. 2001, Van Dyck et al. 2001, Akduman et al. 2002, Black et al. 2002, Ryan et al. 2007, Ho et al. 2009).

Existem vários kits comerciais disponíveis que utilizam diferentes métodos de amplificação e diferentes seqüências-alvo de ácidos nucléicos. Entre os kits que amplificam seqüências do DNA clamidial e gonocócico estão:

- Becton Dickinson BDProbe TecTM ET (Becton, Dickinson and Company) baseia-se na amplificação por deslocamento de fita (*SDA – strand displacement amplification*);
- Roche Cobas[®] Amplicor[®] (Roche Diagnostics Corporation) utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) e permite a detecção simultânea de clamídia e neisseria;
- Abbott LCx[®] (Abbott Laboratories) utiliza a reação em cadeia da ligase (LCR), porém foi retirado do mercado em 2002 devido a problemas com a reprodutibilidade do teste. Amostras que eram analisadas em duplicata apresentavam resultados diferentes sendo este fato mais freqüente entre as amostras de urina (Gronowski et al. 2000, Olshen & Shrier 2005).

Apenas o kit GenProbe APTIMATM amplifica diferentes regiões do RNA ribossomal 23S clamidial e 16S do gonococo e baseia-se na técnica de amplificação mediada por transcrição (TMA). Os kits GenProbe realizam o diagnóstico da *C. trachomatis* (APTIMA CT) ou da *N. gonorrhoeae* (APTIMA GC) separadamente ou simultaneamente (APTIMA Combo 2) (CDC 2002).

Todos os NAATs comercializados permitem a detecção da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae* em amostras de swab endocervical de mulheres, swab uretral de homens e urina de ambos (CDC 2002). A habilidade de detectar estes microrganismos na urina foi a característica mais marcante da criação dos NAATs, pois proporcionou maior adesão de pacientes aos programas de triagem realizados fora do ambiente clínico, uma vez que não era mais necessário o exame pélvico com introdução de espéculo em mulheres para coleta de amostras ou a coleta de swab intra-uretral em homens. A coleta de amostras de forma não invasiva tornou possível o exame em indivíduos assintomáticos e permitiu a realização de estudos epidemiológicos de prevalência e incidência destas infecções na população (Schachter et al. 2005, Fang et al. 2008).

Embora os NAATs tenham aumentado a capacidade de detectar *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* eles apresentam algumas desvantagens como: a possibilidade de ocorrência de reação cruzada com outras espécies de *Neisseria spp*, sendo mais problemática em amostras de origem não genital (Palmer et al. 2003); a impossibilidade de diferenciar microrganismos vivos de mortos e por isso não podem ser utilizados em pacientes que fizeram uso de antibióticos nas três semanas anteriores ao exame (Olshen & Shrier 2005); a possível ocorrência de resultados falso-negativos devido a presença de substâncias nas amostras, como a gonadotrofina coriônica humana (β -HCG), cristais, nitritos e hemoglobina, que são capazes de induzir inibição dos NAATs. Porém, o efeito inibidor pode ser revertido com a diluição da amostra ou com o armazenamento em baixas temperaturas e pode ser detectado com a utilização de um controle interno que indica se houve ou não inibição (Mahony et al. 1998, Cosentino et al. 2003). Além disso, podem ocorrer também resultados falso-positivos principalmente em populações com baixa prevalência das infecções clamidial e gonocócica que resulta em um menor valor preditivo positivo do teste (VPP<90%) (CDC 2002).

Um teste adicional deve ser indicado quando a ocorrência de um resultado falso-positivo possa causar dano social e/ou psicológico para o paciente ou quando o valor preditivo positivo do teste é considerado baixo. Desta forma, recomenda-se que uma nova amostra seja testada com um segundo tipo de NAAT. Caso a coleta de uma nova amostra não seja possível, a amostra original pode ser retestada com outro tipo de NAAT ou também com o teste original (CDC 2002).

1.5 Utilização do swab vaginal nos NAATs

O sucesso da utilização da urina no diagnóstico molecular de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* impulsionou a investigação sobre o uso de novas amostras oriundas de coleta não invasiva. Estudos iniciais mostraram que o swab vaginal se tratava de uma amostra promissora e que tinha sensibilidade comparável às observadas com o uso de swab endocervical (Hook et al. 1997a, 1997b), porém era mais sensível do que a urina na detecção da *C. trachomatis* (Stary et al. 1998). Schachter et al. (2003) sugeriram que a potencial vantagem do swab vaginal em relação a urina é que este requer menos etapas de processamento, reduzindo assim a possibilidade de erros de procedimento, além de ser mais facilmente transportado. Além disso, a sensibilidade dos NAATs utilizando-se urina pode ser reduzida se o volume coletado for maior que o recomendado para o teste (Moncada et al. 2003).

Nos últimos 10 anos, foram publicados vários artigos originais, disponíveis na base de dados do PUBMED (<http://www.pubmed.gov>), objetivando comparar o desempenho de amostras genitais femininas, que incluem urina e swabs endocervical e vaginal, na detecção da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae* empregando os NAATs Amplicor (Roche), LCx (Abbott), ProbeTec ET (Becton Dickinson) e Aptima (GenProbe). Estes estudos apresentam a sensibilidade, especificidade e, em alguns casos, os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) das amostras, e em sua maioria, foi observada superioridade do swab vaginal em relação às outras amostras na detecção destes microrganismos, sendo mais evidente quando comparado à urina (Tabela 1). Além disso, alguns autores mostram a boa aceitabilidade desta amostra pelas pacientes que se sentem confortáveis em coletá-la (Holland-Hall et al. 2002, Chernesky et al. 2005, Hoebe et al. 2006, Rose et al. 2007). No Brasil nenhum estudo de prevalência das infecções clamidial e gonocócica avaliou o desempenho desta amostra como uma alternativa ao uso da urina e do swab endocervical.

Apesar do bom desempenho e da boa aceitabilidade, a *Food and Drug Administration* (FDA) validou, até o momento, o uso do swab vaginal apenas pelo kit GenProbe APTIMA™ Combo 2 (GenProbe) desde que este seja coletado por um clínico ou pela paciente em ambiente clínico (Hobbs et al. 2008). Possivelmente a validação do uso do swab vaginal apenas por este kit seja devido ao seu ótimo desempenho na detecção das infecções clamidial e gonocócica com diferentes tipos de amostras biológicas. Os artigos originais disponíveis na base de dados do PUBMED

publicados nos últimos 10 anos e que avaliaram a sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de um NAAT na detecção da clamídia e da neisseria comparando-o com outros tipos de NAATs (Amplicor x Aptima, Amplicor x LCx, Amplicor x ProbeTec, Abbott x ProbeTec, Abbott x Aptima e ProbeTec x Aptima), mostram semelhança de desempenho entre os kits da Roche, Abbott, ProbeTec e GenProbe APTIMA™ na pesquisa da infecção clamidial em amostras genitais masculinas e femininas. Entretanto, alguns estudos mais recentes evidenciaram que o kit GenProbe APTIMA™ Combo 2 apresenta maior sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo em relação aos outros NAATs na pesquisa da *N. gonorrhoeae* (Tabelas 2 e 3).

Embora o kit GenProbe APTIMA™ Combo 2 apresente bom desempenho na pesquisa da infecção clamidial e seja superior aos outros NAATs na pesquisa da infecção gonocócica, este kit ainda não é comercializado no Brasil e não consta na lista dos kits de biologia molecular aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA 2010). No país, o NAAT mais utilizado nos estudos epidemiológicos destas infecções é o kit AMPLICOR CT/NG (Roche) (Alacaraz et al. 2000, Ramos et al. 2002, Santos et al. 2003, Fioravante et al. 2005, Araújo et al. 2006, Fernandes et al. 2009).

Tabela 1. Comparação do desempenho das amostras genitais femininas na pesquisa da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae* pelos diferentes tipos de NAATs.

Autor e ano	População	Bactéria	NAAT	Amostras	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
Tshibaka et al. 2000	Profissionais do sexo (N=342)	NG	PCR (Roche)	U	53,8	98,9	93,5	87,5
				SE	91,5	100	100	97,4
Hjelm et al. 2001	Clínica de DST (N=1001)	CT	LCR (Abbott)	U	80,0	100	ND	ND
				SE	92,0	99,6	ND	ND
				SV (AC)	96,0	99,4	ND	ND
Black et al. 2002	Clínicas de DST, Planejamento Familiar (N=3191)	CT	LCR (Abbott)	U	82,6	96,6	ND	ND
				SE	96,9	97,5	ND	ND
Chandeying et al. 2002	Departamento de ginecologia (N=430)	CT	PCR (Roche)	U	71,4	100	ND	ND
				SE	100	100	ND	ND
				SV (AC)	85,7	99,2	ND	ND
Garrow et al. 2002	Mulheres que realizavam exame ginecológico em consultórios médicos ou que eram atendidas por enfermeiras nas comunidades (N=349)	CT	PCR <i>in-house</i>	U	79,0	100	100	98,0
				SE	79,0	100	100	98,0
				SV	89,0	100	100	99,0
		NG	PCR <i>in-house</i>	U	83,0	100	100	99,0
				SE	91,0	100	100	99,0
				SV	96,0	99,0	92,0	100

S - Sensibilidade; **E** - Especificidade; **VPP** - Valor Preditivo Positivo; **VPN** - Valor Preditivo Negativo; **CT** - *C. trachomatis*; **NG** - *N. gonorrhoeae*; **U** - Urina; **SE** - swab endocervical; **SV** - swab vaginal auto-coletado; **NAATs** - testes de amplificação de ácidos nucleicos; **SDA** - amplificação por deslocamento de fita; **PCR** - reação em cadeia da polimerase; **LCR** - reação em cadeia da ligase; **ND** - Não disponível no artigo; **N** - Número da população.

Continuação Tabela 1. Comparação do desempenho das amostras genitais femininas na pesquisa da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae* pelos diferentes tipos de NAATs.

Autor e ano	População	Bactéria	NAAT	Amostras	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
Knox et al. 2002	Pacientes submetidas à exame de rotina em clínica ginecológica (N=318)	CT	PCR (Roche)	U	72,7	100	100	96,4
				SE	92,3	99,5	96,0	99,1
				SV (AC)	84,6	99,6	96,6	98,0
		NG	PCR (Roche)	U	31,2	100	100	91,6
				SE	92,6	100	100	99,1
				SV (AC)	71,6	100	100	96,4
Semeniuk et al. 2002	Clínicas de DST, ginecologia e obstetrícia e planejamento familiar (N=504)	CT	PCR (Roche)	U	88,5	99,4	88,5	99,4
				SE	100	98,5	80,0	100
Cosentino et al. 2003	Clínicas de DST e de saúde primária (N=455)	CT	SDA (ProbeTec)	SE	91,9	99,5	94,4	99,3
				SV (AC)	91,9	99,8	97,1	99,3
		NG	SDA (ProbeTec)	SE	100	100	100	100
				SV (AC)	100	99,8	97,5	100
Gaydos et al. 2003	Clínicas de DST, ginecologia e obstetrícia e planejamento familiar (CT N=1391 e NG N=1484)	CT	TMA (Aptima C2)	U	94,7	98,9	93,8	99,1
				SE	94,2	97,6	87,4	99,0
		NG	TMA (Aptima C2)	U	91,3	99,3	92,1	99,2
				SE	99,2	98,7	88,1	99,9

S - Sensibilidade; **E** - Especificidade; **VPP** - Valor Preditivo Positivo; **VPN** - Valor Preditivo Negativo; **CT** - *C. trachomatis*; **NG** - *N. gonorrhoeae*; **U** - Urina; **SE** - swab endocervical; **SV** - swab vaginal auto-coletado; **NAATs** - testes de amplificação de ácidos nucléicos; **SDA** - amplificação por deslocamento de fita; **PCR** - reação em cadeia da polimerase; **LCR** - reação em cadeia da ligase; **TMA** - transcrição mediada por amplificação; **ND** - Não disponível no artigo; **N** - Número da população.

Continuação Tabela 1. Comparação do desempenho das amostras genitais femininas na pesquisa da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae* pelos diferentes tipos de NAATs.

Autor e ano	População	Bactéria	NAAT	Amostras	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
George et al. 2003	Clínica de DST (N=80)	CT	PCR <i>in-house</i>	U	86,4	100	100	95,1
				SE	100	100	100	100
Macmillam et al. 2003	Departamento de ginecologia e obstetrícia (N=302)	CT	LCR (Abbott)	U	87,0	100	ND	ND
				SE	83,0	100	ND	ND
				SV (AC)	100	100	ND	ND
Schachter et al. 2003	Clínicas de DST, ginecologia e obstetrícia, planejamento familiar (N=504)	CT	TMA (Aptima CT)	U	72,0	99,5	ND	ND
				SE	89,1	99,3	ND	ND
				SV (AC)	93,3	99,6	ND	ND
				SV (CC)	89,9	99,4	ND	ND
			PCR (Roche)	U	84,0	99,0	ND	ND
				SE	90,7	99,4	ND	ND
				SV (AC)	90,7	99,0	ND	ND
				SV (CC)	93,3	98,8	ND	ND
			LCR (Abbott)	U	97,9	98,1	ND	ND
				SE	95,8	99,8	ND	ND
				SV (AC)	97,9	99,5	ND	ND
				SV (CC)	100	99,8	ND	ND

S - Sensibilidade; **E** - Especificidade; **VPP** - Valor Preditivo Positivo; **VPN** - Valor Preditivo Negativo; **CT** - *C. trachomatis*; **NG** - *N. gonorrhoeae*; **U** - Urina; **SE** - swab endocervical; **SV (AC)** - swab vaginal auto-coletado; **SV (CC)** - swab vaginal coletado pelo clínico; **NAATs** - testes de amplificação de ácidos nucleicos; **SDA** - amplificação por deslocamento de fita; **PCR** - reação em cadeia da polimerase; **LCR** - reação em cadeia da ligase; **TMA** - transcrição mediada por amplificação; **ND** - Não disponível no artigo; **N** - Número da população.

Continuação Tabela 1. Comparação do desempenho das amostras genitais femininas na pesquisa da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae* pelos diferentes tipos de NAATs.

Autor e ano	População	Bactéria	NAAT	Amostras	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
Schachter et al. 2005	Clínicas de DST, ginecologia e obstetrícia, planejamento familiar (N=1464)	CT	TMA (Aptima C2)	SV (AC)	96,6	97,6	ND	ND
				SV (CC)	96,7	97,1	ND	ND
		NG	TMA (Aptima C2)	SV (AC)	98,7	99,6	ND	ND
				SV (CC)	96,2	99,4	ND	ND
Skidmore et al. 2006	Mulheres convidadas por correio (N=2745)	CT	PCR e SDA	U	91,8	99,8	97,1	99,5
				SV	97,3	99,7	94,0	99,8
Fang et al. 2008	Adolescentes atendidas em clínica para adolescentes (N=350)	CT	SDA (ProbeTec)	U	89,2	95,6	95,2	94,9
				SE	90,1	99,2	96,2	98,5
				SV	97,3	94,8	94,7	95,1
		NG	SDA (ProbeTec)	U	88,6	96,2	95,1	96,0
				SE	95,5	99,7	100	99,5
				SV	100	94,7	88,0	95,2
Berwald et al. 2009	Mulheres recrutadas em departamento de emergência (N=162)	CT	PCR (Roche)	SE	100	100	ND	ND
				SV	91,0	99,0	ND	ND
Haugland et al. 2010	Clínica de DST (N=603)	CT	SDA (ProbeTec)	U	90,2	98,3	89,0	98,3
				SE	89,0	99,2	94,7	99,2

S - Sensibilidade; **E** - Especificidade; **VPP** - Valor Preditivo Positivo; **VPN** - Valor Preditivo Negativo; **CT** - *C. trachomatis*; **NG** - *N. gonorrhoeae*; **U** - Urina; **SE** - swab endocervical; **SV (AC)** - swab vaginal auto-coletado; **SV (CC)** - swab vaginal coletado pelo clínico; **NAATs** - testes de amplificação de ácidos nucleicos; **SDA** - amplificação por deslocamento de fita; **PCR** - reação em cadeia da polimerase; **TMA** - transcrição mediada por amplificação; **ND** - Não disponível no artigo; **N** - Número da população.

Tabela 2. Comparação de NAATs na pesquisa da *C. trachomatis* empregando diferentes tipos de amostras biológicas.

Autor e Ano	População	Amostras	NAATs	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
Chan et al. 2000	Clínica de DST e consultórios médicos (Mulheres=399; Homens=825)	Urina F	SDA (ProbeTec)	95,2	99,1	93,0	99,4
			PCR (Roche)	97,6	97,9	85,4	99,7
		Urina M	SDA (ProbeTec)	95,3	99,4	96,8	99,1
			PCR (Roche)	95,3	98,5	92,4	99,1
van Doornum et al. 2001	Clínicas de DST (Mulheres=503; Homens=498)	SE	LCR (Abbott)	92,1	99,3	95,1	98,9
			PCR (Roche)	96,8	99,1	93,8	99,5
		Urina F	LCR (Abbott)	88,9	99,1	93,3	98,4
			PCR (Roche)	82,5	99,8	98,1	97,6
		SU	LCR (Abbott)	90,0	99,6	95,7	98,9
			PCR (Roche)	98,0	99,1	92,5	99,8
Urina M	LCR (Abbott)	94,0	98,4	87,0	99,3		
	PCR (Roche)	92,0	100	100	99,1		
Gaydos et al. 2004	Clínicas de saúde de escolas (N=506)	Urina (M e F)	LCR (Abbott)	96,0	99,1	94,7	99,3
			SDA (ProbeTec)	96,0	100	100	99,3
			TMA (Aptima C2)	100	98,8	93,8	100

S - Sensibilidade; **E** -Especificidade; **VPP** - Valor Preditivo Positivo; **VPN** - Valor Preditivo Negativo; **F** - Feminina; **M** - Masculina; **SE** - Swab Endocervical; **SU** - Swab Uretral; **NAATs** -Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos; **SDA** - Amplificação por Deslocamento de Fita; **PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase; **LCR** - Reação em Cadeia da Ligase; **TMA** - Amplificação Mediada por Transcrição; **N** - Número da população.

Continuação Tabela 2. Comparação de NAATs na pesquisa da *C. trachomatis* empregando diferentes tipos de amostras biológicas.

Autores e Ano	População	Amostras	NAATs	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
Lowe et al. 2006	Laboratórios de análises clínicas, Austrália (N=2973)	Urina (M e F)	TMA (Aptima C2)	100	99,8	98,1	100
			PCR (Roche)	90,5	100	100	98,9
Levett et al. 2008	Laboratórios de controle de doenças, Canadá (N=500)	Urina (M e F)	TMA (Aptima C2)	98,9	100	100	99,7
			SDA (ProbeTec)	97,9	99,5	97,9	99,5
Masek et al. 2009	Mulheres recrutadas pela internet (N=500)	SV	SDA(ProbeTec)	82,6	100	100	98,3
			TMA (Aptima C2)	100	100	100	100
			PCR (Roche)	100	99,3	93,9	100

S - Sensibilidade; **E** –Especificidade; **VPP** - Valor Preditivo Positivo; **VPN** - Valor Preditivo Negativo; **F** - Feminina; **M** - Masculina; **SV** - Swab Vaginal; **NAATs** - Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos; **SDA** - Amplificação por Deslocamento de Fita; **PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase; **TMA** - Amplificação Mediada por Transcrição; **N** - Número da população.

Tabela 3. Comparação de NAATs na pesquisa da *N. gonorrhoeae* empregando diferentes tipos de amostras biológicas.

Autores e Ano	População	Amostras	NAATs	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
Chan et al. 2000	Clínica de DST e consultórios médicos (Mulheres=399; Homens=825)	Urina F	SDA (ProbeTec)	100	99,2	66,7	100
			PCR (Roche)	100	98,4	50,0	100
		Urina M	SDA (ProbeTec)	100	99,9	96,3	100
			PCR (Roche)	96,2	99,1	78,1	99,9
Farrel & Sheedy 2001	Pessoas de várias regiões de alta prevalência de Queensland, Austrália (N=260)	Urina (M e F)	LCR (Abbott)	95,7	100	100	99,1
			PCR (Roche)	97,9	93,9	78,0	99,5
van Doornum et al. 2001	Clínicas de DST (Mulheres=503; Homens=498)	SE	LCR (Abbott)	100	100	100	100
			PCR (Roche)	100	97,4	31,6	100
		Urina F	LCR (Abbott)	100	100	100	100
			PCR (Roche)	66,7	98,6	36,4	99,6
		SU	LCR (Abbott)	100	100	100	100
			PCR (Roche)	100	99,2	84,0	100
		Urina M	LCR (Abbott)	95,2	100	100	99,8
			PCR (Roche)	95,2	99,4	87,0	99,8

S - Sensibilidade; **E** -Especificidade; **VPP** - Valor Preditivo Positivo; **VPN** - Valor Preditivo Negativo; **F** - Feminina; **M** - Masculina; **SE** - Swab Endocervical; **SU** - Swab Uretral; **NAATs** -Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos; **SDA** - Amplificação por Deslocamento de Fita; **PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase; **LCR** - Reação em Cadeia da Ligase; **N** - Número da população.

Continuação Tabela 3. Comparação de NAATs na pesquisa da *N. gonorrhoeae* empregando diferentes tipos de amostras biológicas.

Autores e Ano	População	Amostras	NAATs	S(%)	E(%)	VPP(%)	VPN(%)
Lowe et al. 2006	Laboratórios de análises clínicas, Austrália (N=1535)	Urina (M e F)	TMA (Aptima C2)	100	100	100	100
			PCR (Roche)	86,7	99,8	92,9	99,6
Levett et al. 2008	Laboratórios de controle de doenças, Canadá (N=500)	Urina (M e F)	TMA (Aptima C2)	100	100	100	100
			SDA (ProbeTec)	95,8	100	100	99,8
Masek et al. 2009	Mulheres recrutadas pela internet (N=500)	SV	SDA (ProbeTec)	80,0	100	100	99,8
			TMA (Aptima C2)	100	100	100	100
			PCR (Roche)	100	98,8	45,5	100

S - Sensibilidade; **E** -Especificidade; **VPP** - Valor Preditivo Positivo; **VPN** - Valor Preditivo Negativo; **F** - Feminina; **M** - Masculina; **SV** - Swab Vaginal; **NAATs** - Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos; **SDA** - Amplificação por Deslocamento de Fita; **PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase; **TMA** - Amplificação Mediada por Transcrição; **N** - Número da população.

2 JUSTIFICATIVA

O rastreamento das infecções clamidial e gonocócica é importante e necessário, pois são infecções freqüentes em adolescentes e jovens, são em sua maioria assintomáticas e têm potencial de provocarem complicações e seqüelas graves em mulheres não tratadas. Uma possível estratégia para reduzir a prevalência destas DST é a expansão do rastreamento para locais fora do ambiente clínico como escolas, universidades, clínicas de reabilitação de usuários de droga, centros de detenção e outros.

Os testes de amplificação de ácidos nucléicos (NAATs), além de apresentarem alta sensibilidade, permitem a utilização de amostra biológica coletada pelo próprio paciente e de forma não invasiva, como o swab vaginal, na detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. A possibilidade de coleta de amostra sem a presença de um profissional para a realização de exame pélvico em mulheres pode viabilizar a execução de estudos epidemiológicos fora do ambiente clínico com maior adesão dos pacientes.

Alguns autores evidenciaram o bom desempenho do swab vaginal na detecção das infecções clamidial e gonocócica (Garrow et al. 2002, Schachter et al. 2003, Shafer et al. 2003, Schachter et al. 2005). Entretanto, até o momento, nenhum estudo epidemiológico sobre as infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* realizado no Brasil utilizou o swab vaginal como uma alternativa ao uso da urina e swab endocervical (Soares et al. 2003, Araújo et al. 2006, Fernandes et al. 2009).

Embora a *Food and Drug Administration* (FDA) tenha aprovado, até o momento, a utilização do swab vaginal apenas pelo kit Gen-Probe APTIMA™ Combo 2 (Gen-Probe), no Brasil, este NAAT ainda não está disponível. Desta forma, o presente estudo se propôs a avaliar o desempenho do swab vaginal utilizando o kit Amplicor-Roche com o objetivo de fornecer subsídios para a realização de programas de rastreamento das infecções clamidial e gonocócica no país, especialmente em mulheres jovens com risco de adquirirem estas DST e que não procuram os serviços de saúde.

3 OBJETIVOS

- Avaliar o desempenho do kit AMPLICOR CT\NG (Roche) no diagnóstico de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* empregando urina, swabs endocervical e vaginal.
- Avaliar a concordância de resultados entre os três espécimes biológicos.

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas

O presente estudo faz parte da linha de pesquisa “Doenças Sexualmente Transmissíveis em adolescentes e jovens: epidemiologia, diagnóstico, prevalência, fatores de risco e prevenção” e está inserido no projeto denominado “Estudo de prevalência de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em adolescentes e jovens do sexo feminino do Estado de Goiás”, realizado em três cidades de médio porte do interior do Estado. Uma das cidades participantes do projeto foi Inhumas que está localizada a 48 km da capital, Goiânia e apresenta 44983 habitantes, de onde a população participante do estudo foi recrutada.

O projeto foi denominado “Adolescer com Saúde” para evitar a identificação pública das adolescentes e jovens sexualmente ativas. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (protocolo N° 086/06) (Anexo A). Todas as participantes foram devidamente informadas sobre os objetivos da pesquisa e assinaram voluntariamente os termos de consentimento livre e esclarecido.

As adolescentes com menos de 18 anos casadas ou que vivem em união consensual puderam assinar o consentimento informado sem autorização dos pais. No caso de adolescentes com menos de 18 anos, solicitou-se autorização da autoridade judicial (Ministério Público e Juizado da Infância e Juventude) para que essas adolescentes participassem da pesquisa, inclusive assinando o consentimento informado. A necessidade da autorização da família quebraria a confidencialidade, afastando as adolescentes da pesquisa. Neste caso, ficariam impedidas de receber os benefícios que seriam o diagnóstico correto das DST mais frequentes e o tratamento etiológico.

Todas as participantes que tiveram pelo menos uma amostra com resultado positivo para *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae* receberam tratamento para os respectivos agentes infecciosos. O tratamento foi também oferecido para os parceiros sexuais destas participantes.

O fluxograma demonstrando a metodologia do estudo está representado na figura 1.

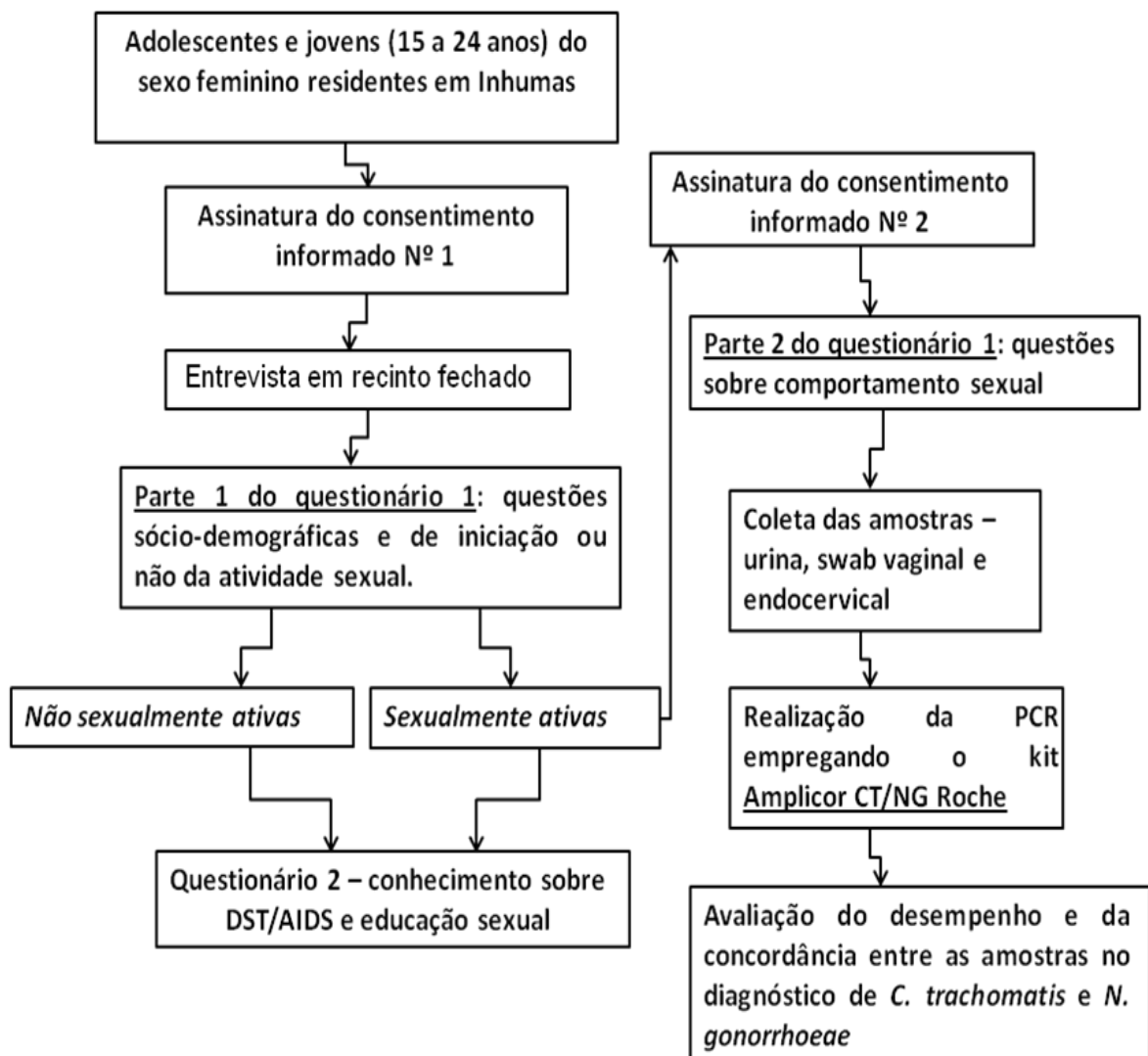


Figura 1. Fluxograma representativo da metodologia do estudo.

4.2 População de estudo

A população alvo foi constituída por adolescentes e jovens do sexo feminino com idade entre 15 e 24 anos residentes no município de Inhumas. A cidade apresenta uma população de 4171 habitantes do sexo feminino nesta faixa etária (IBGE 2007). A população foi recrutada entre os meses de setembro de 2008 a junho de 2009 e foi composta por adolescentes e jovens cadastradas no Programa de Saúde da Família do município e pelas estudantes do Centro Federal de Educação e Tecnologia (CEFET) de Inhumas, hoje denominado Instituto Federal de Goiás (IFG).

Neste trabalho foram utilizadas amostras de pacientes que participaram de um estudo prévio que tinha o objetivo de estimar as prevalências de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* na cidade de Inhumas. O tamanho da amostra foi estabelecido para detectar prevalência de 10% de infecção por *C. trachomatis* (5% de precisão e 95% o nível de confiabilidade) e de 2% da infecção por *N. gonorrhoeae* (1,5% de precisão e 95% o nível de confiabilidade) em mulheres de 15 a 24 anos de idade. Estes valores foram definidos com base em estudos de prevalências das infecções clamidial e gonocócica já publicados na literatura.

O cálculo da amostra priorizou a infecção de menor prevalência estimada resultando em uma amostra de 311 jovens. Acrescentou-se 62 participantes considerando um percentual de 20% de recusas entre aquelas sorteadas. Considerando, ainda, que 60% das mulheres entre 15 e 24 anos de idade têm vida sexual ativa, foi necessário sortear mais 40% (149) de potenciais participantes para atingir a amostra necessária. No total foram sorteadas e convidadas a participar do estudo, aproximadamente, 522 adolescentes ou jovens do sexo feminino.

4.3 Entrevista

As adolescentes e jovens foram recebidas por um membro da equipe de pesquisa que lhes explicou seu objetivo. Em seguida assinaram o consentimento informado nº1 (Anexo B) e foram encaminhadas para entrevista com enfermeira, em recinto fechado, para permitir a confidencialidade. Neste local, responderam à primeira parte do questionário 1 (Anexo D) contendo questões sócio-demográficas, de saúde, questões familiares e se eram ou não sexualmente ativas.

As adolescentes que relatavam ser sexualmente ativas e que não estavam grávidas foram então convidadas para participar da pesquisa sobre DST. Para participar desta fase da pesquisa foi necessária a assinatura do consentimento informado nº2 (Anexo C). Após a assinatura do consentimento, as adolescentes foram entrevistadas através da 2ª parte do questionário 1 (Anexo D), contendo questões sobre a prática sexual e vida reprodutiva. Em seguida, foram encaminhadas para a coleta das amostras biológicas.

As adolescentes que não tinham vida sexual respondiam apenas a primeira parte do questionário nº1 e recebiam informações sobre DST e se necessário eram encaminhadas para vacinação.

Todas as adolescentes responderam ao questionário 2 contendo questões sobre DST/AIDS e educação sexual.

4.4 Coleta das amostras e transporte

As adolescentes sexualmente ativas foram encaminhadas para a coleta de aproximadamente 20 mL de urina de primeiro jato, em tubo estéril. As pacientes foram orientadas a não urinar por pelo menos 2 horas antes da coleta. Em seguida, foram encaminhadas para a realização do exame ginecológico e coleta das amostras de swab vaginal e endocervical pela médica ginecologista membro da equipe do projeto.

A amostra vaginal era colhida introduzindo-se o swab de algodão por cerca de 3 a 4 cm na cavidade vaginal e fazendo-se movimentos rotatórios por toda a circunferência da região. Em seguida, o swab era imerso e agitado, por cerca de 15 segundos, em um tubo contendo 1 mL de meio de transporte composto por Tris-HCL e EDTA que foi preparado e padronizado em nosso laboratório. O swab era comprimido contra as paredes do tubo para retirar o excesso de líquido e então descartado.

Após a coleta do swab vaginal, introduzia-se o espéculo para a coleta de amostra para realização de exame citológico e do swab endocervical. A amostra para o exame citológico era coletada primeiro. Em seguida, fazia-se a coleta do swab endocervical utilizando o kit de coleta Digene que contém escova e meio de transporte. A escova era introduzida de 1 a 1,5 cm no canal endocervical e rotacionada 360° e, então, era armazenada no tubo contendo meio de transporte. O exame citológico foi realizado por outros colaboradores do projeto e seus dados não serão utilizados neste estudo.

As adolescentes que estavam menstruadas ou que usaram antimicrobianos orais ou tópicos nos últimos 15 dias não coletaram nenhuma das amostras e foram convidadas para retornarem outro dia e realizarem a coleta.

As amostras de urina e swabs vaginal e endocervical coletadas foram encaminhadas para o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular Aplicadas às Doenças Infecciosas do IPTSP/UFG, onde foram congeladas a - 20°C até a realização das análises.

4.5 Diagnóstico laboratorial

As amostras foram examinadas empregando o kit AMPLICOR CT/NG (Roche Molecular Systems, Branchburg, N.J.).

O teste AMPLICOR CT/NG é um ensaio multiplex, qualitativo, que permite a amplificação do DNA de *C. trachomatis*, de *N. gonorrhoeae* e do controle interno (CI) da reação, simultaneamente. O CI é uma seqüência de DNA, com regiões de ligação de *primers* idênticas à da seqüência alvo de *C. trachomatis* e com tamanho e composição de bases similares a essa seqüência. O CI foi adicionado em todas as amplificações para monitorar o processo de amplificação. As amostras podem conter substâncias que inibem a ação da Taq DNA polimerase que é evidenciada pela não amplificação do CI invalidando-se assim o resultado do teste. Se o controle interno é corretamente amplificado em uma reação, pode-se validar o resultado (Rosenstraus et al. 1998).

O teste AMPLICOR CT/NG é realizado em três etapas: processamento das amostras, amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e detecção.

4.5.1 Processamento das amostras

O processamento é a etapa de preparação da amostra para a amplificação e era realizado na sala de pré-amplificação. Diferente das etapas de amplificação e detecção, o processamento é a única fase do teste que varia de acordo com a amostra utilizada:

Urina - Um volume de 500 µL das amostras de urina foi adicionado a 500 µL de tampão de lavagem. Após uma incubação de 15 minutos a 37°C, as amostras foram centrifugadas a 12.500 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* (contendo células epiteliais, leucócitos ou células associadas a *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*) foi tratado com 250 µL de tampão de lise e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 250 µL de diluente de amostras, para a extração do DNA, e as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.500 x g.

Swab endocervical - Os swabs endocervicais foram processados adicionando-se 100 µL da amostra a 100 µL de tampão de lise. Esta etapa de lise foi necessária, pois os swabs foram coletados utilizando-se o kit de coleta Digene. As amostras foram então incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200

µL de tampão diluente e as amostras foram novamente incubadas nas mesmas condições.

Swab vaginal - O teste AMPLICOR CT/NG recomenda o diagnóstico das infecções clamidial e gonocócica apenas em amostras de swab endocervical e urina. Desta forma, não há em seu manual instruções para o processamento do swab vaginal. Assim, foram feitos testes iniciais para definir o melhor tipo de processamento. Para estes testes, foram selecionadas algumas amostras de swab vaginal de pacientes com amostras de urina previamente analisadas. Parte destas amostras foi processada de acordo com as recomendações para o processamento da urina e outra parte de acordo com o processamento do swab endocervical. Em seguida, fez-se a amplificação e a detecção. Ao final da PCR os resultados dos swabs vaginais foram avaliados e comparados com os resultados das amostras de urina.

Todos os swabs vaginais testados apresentaram os mesmos resultados encontrados na urina independente do tipo de processamento a que foram submetidos, ou seja, se a urina tinha resultado negativo para *C. trachomatis* e/ou *N. gonorrhoeae*, o swab vaginal da paciente também apresentou resultado negativo e o mesmo aconteceu com os casos positivos. Os resultados dos swabs vaginais não foram comparados com os resultados dos swabs endocervicais, pois estes ainda não tinham sido testados.

Como os resultados não diferiram e o processamento do swab endocervical é menos laborioso e mais rápido em relação ao processamento da urina, decidiu-se que as amostras de swab vaginal seriam processadas como os swabs endocervicais.

Todas as amostras biológicas processadas foram armazenadas entre 2 e 8°C por pelo menos 3 dias (e no máximo 7 dias), para evitar a inibição da enzima Taq DNA polimerase durante a PCR, induzida por possíveis substâncias inibidoras presentes nas amostras (Mahony et al. 1998).

4.5.2 Amplificação dos DNAs alvos de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*

Do sobrenadante das amostras processadas, foi retirada uma alíquota de 50 µL e adicionada a 50 µL de Master Mix de trabalho que contém as seqüências de *primers* biotiniladas CP24 e CP27 para a *C. trachomatis* e para o CI e SS01 e SS02 para *N. gonorrhoeae*, a enzima Taq DNA polimerase, os deoxinucleosídeos trifosfato livres

(dUTP, dATP, dGTP e dCTP) e a enzima AmpErase. Além do CI, foram usados um controle positivo e um negativo para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em cada amplificação.

Os *primers* usados no ensaio amplificam uma seqüência de aproximadamente 208 nucleotídeos dentro do plasmídeo críptico comum a todas as sorovariades de *C. trachomatis* e uma seqüência de 201 nucleotídeos do gene da enzima metiltransferase do DNA, uma região conservada entre as cepas de *N. gonorrhoeae*.

A enzima AmpErase permite a amplificação seletiva do DNA alvo, impedindo que haja contaminação das amostras com seqüências amplificadas de outras reações. Essa enzima degrada as fitas de DNA contendo deoxiuridina, que é adicionada ao teste, mas não é encontrada no material genético a ser amplificado. Em temperaturas acima de 55°C, a AmpErase é inativada. Assim, após o início do ciclo de amplificação, ocorre a inativação da enzima, impedindo que o DNA recém-amplificado seja destruído.

A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk Conn.) no qual as amostras passam por um ciclo contendo as fases de desnaturação da fita dupla de DNA, anelamento dos *primers* e extensão das fitas que estão sendo copiadas. Ao final de 35 ciclos, a temperatura é mantida a 72°C e a adição de uma solução desnaturante promove a perda de função de qualquer resíduo enzimático na solução e transforma as fitas duplas de DNA em fita simples. Estes procedimentos foram realizados na sala de amplificação.

4.5.3 Detecção dos DNAs alvos amplificados

Uma alíquota de 25 µL do DNA amplificado e desnaturado foi adicionada a 100 µL de tampão de hibridização em três microplacas plásticas, revestidas com sondas de oligonucleotídeos complementares à seqüência de DNA alvo da *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e à seqüência do CI, respectivamente. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e em seguida, lavadas por sete vezes com tampão de lavagem. Adicionou-se 100 µL de conjugado avidina-peroxidase e as placas foram novamente incubadas a 37°C por 15 minutos e lavadas sete vezes. O substrato contendo peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) foi preparado no momento do ensaio e 100 µL foram acrescentados às placas. Após 10 minutos no escuro e à temperatura ambiente a

reação foi interrompida com 100 µL de ácido sulfúrico. A determinação da absorbância foi realizada a 450nm em leitora de microplacas Behring EL 311.

As amostras foram consideradas negativas ou positivas de acordo com as instruções do fabricante:

- Negativa para *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*: densidade ótica (DO) < 0,2, com a DO do CI \geq 0,2.
- Positiva para *C. trachomatis*: DO \geq 0,8, independente da DO do CI.
- Positiva para *N. gonorrhoeae*: DO \geq 0,2, independente da DO do CI.
- Inibição da reação: DO da amostra e do CI < 0,2 e neste caso a PCR era repetida diluindo-se a amostra processada a 1:10.
- Indeterminado para a *C. trachomatis*: DO \geq 0,2 e < 0,8, o teste era repetido na amostra original.
- No caso da pesquisa de *N. gonorrhoeae* a amostra não era classificada como indeterminada e todas as amostras com resultado presumivelmente positivo eram novamente testadas na amostra original.

4.6 Processamento e análise dos dados

Foi criado um arquivo eletrônico para armazenamento dos dados que foram analisados utilizando o programa Epi Info. Foi feita uma análise descritiva das principais características sócio-demográficas, de comportamento sexual e da prevalência da *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*.

As prevalências das infecções clamidial e gonocócica foram calculadas considerando um resultado como verdadeiro positivo quando pelo menos duas das três amostras coletadas da mesma paciente, que incluem urina, swabs vaginal e endocervical, fossem positivas. Foram calculados os percentuais de positividade para as

infecções nos diferentes espécimes biológicos e seus respectivos intervalos de confiança (IC95%).

Foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) para analisar o desempenho da PCR no diagnóstico de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* empregando urina, swabs endocervical e vaginal. Para avaliar a reprodutibilidade foram calculadas a taxa global de concordância e o coeficiente kappa (índice de concordância ajustada). Foi considerada uma concordância pobre quando $\text{kappa} < 0$, fraca 0-0,20, razoável 0,21-0,40, moderada 0,41-0,60, substancial 0,61-0,80 e ótima 0,81-1,00 (Landis & Koch 1977). Empregou-se o teste do *qui*-quadrado para a comparação dos resultados obtidos nos diferentes tipos de amostras e para a comparação dos dados do presente estudo com dados da literatura. O nível de significância foi definido em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Características sócio-demográficas e de comportamento sexual da população estudada

Foram recrutadas 651 adolescentes e jovens. Mais de 65% (428) delas relataram ter vida sexualmente ativa e foram convidadas a participar do estudo, a média de idade neste grupo foi de 19,4 anos ($dp=2,6$). Aproximadamente 51% das participantes tinham idade entre 15 e 19 anos, 64,3% eram solteiras ou divorciadas e 55,4% relataram renda familiar mensal de 2 a 4 salários mínimos. O nível de escolaridade da maioria das adolescentes estava de acordo com a faixa etária da população, 60,8% das participantes cursavam ou concluíram o ensino médio. Entretanto, foi elevada (20,3%) a quantidade de participantes que ainda cursavam o ensino fundamental. As características sócio-demográficas da população recrutada estão descritas na Tabela 4.

Quanto ao comportamento sexual, 76,4% das pacientes iniciaram a atividade sexual com idade igual ou superior a 15 anos e 53,8% referiram ter tido dois ou mais parceiros sexuais. Entretanto, a quantidade de participantes que tiveram apenas um parceiro sexual também foi elevada (45,3%). Quanto ao uso do preservativo, 78% usavam de forma inconsistente (às vezes, raramente ou nunca) e entre estas, 11,9% afirmaram nunca terem usado preservativo. Cerca de 36% das participantes tiveram gravidez anterior e 67,3% destas engravidaram com idade entre 16 e 20 anos. Foi observado um alto índice de adolescentes que engravidaram antes dos 15 anos (23,5%). Os dados do comportamento sexual das participantes do estudo podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 4. Características sócio-demográficas de 428 adolescentes e jovens sexualmente ativas recrutadas nos postos do PSF do município de Inhumas, Goiás.

Variáveis	n	(%)
Idade (anos)		
15 a 19	221	51,6
20 a 24	207	48,4
Estado civil		
Solteira/Divorciada	275	64,3
Casada/ União consensual	153	35,7
Renda familiar		
< 2 SM	124	29,0
2 a 4 SM	237	55,4
5 a 10 SM	53	12,5
> 10 SM	8	1,9
Não sabe	6	1,4
Nível de escolaridade		
Não estudou	1	0,2
2° a 5° ano do ensino fundamental	16	3,8
6° a 9° ano do ensino fundamental	87	20,3
Ensino médio incompleto	181	42,3
Ensino médio completo	79	18,5
Curso superior incompleto	63	14,7
NR	1	0,2

NR: não respondeu

Tabela 5. Características do comportamento sexual de 428 adolescentes e jovens recrutadas nos postos do PSF do município de Inhumas, Goiás.

Variáveis	n	(%)
Idade na primeira relação (anos)		
<15	100	23,4
≥15	327	76,4
NR	1	0,2
Nº de parceiros durante a vida		
1	194	45,3
2 a 3	130	30,4
4 a 10	86	20,1
>10	14	3,3
NR	4	0,9
Uso de preservativo		
Sempre	92	21,5
Às vezes	165	38,5
Raramente	118	27,6
Nunca	51	11,9
NR	2	0,5
Gravidez anterior		
Sim	153	35,7
Não	270	63,1
NR	5	1,2
Idade na 1ª gravidez		
≤ 15	36	23,5
16 a 20	103	67,3
21 a 24	12	7,9
NR	2	1,3

NR: não respondeu

5.2 Prevalências das infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*

Dentre as 428 adolescentes sexualmente ativas que participaram do estudo, 309 (72,2%) coletaram os três espécimes biológicos. Entre as 119 (27,8%) participantes restantes, 52 (43,7%) coletaram apenas um ou dois tipos de amostras e 67 (56,3%) adolescentes não coletaram nenhum tipo de espécime biológico (Tabela 6). No total, 275 amostras não foram coletadas, entre estas, 72 urinas, 97 swabs vaginais e 106 swabs endocervicais.

Destas 275 amostras, 187 não foram coletadas porque as participantes estavam menstruadas (54,2%), em uso de antibiótico (9,8%) ou suspeitavam de gravidez (4,0%). Entre as outras 88 amostras, 5 (1,8%) urinas não foram coletadas porque as participantes não esperaram pelos menos duas horas sem urinar antes da coleta de urina, 8 (2,9%) swabs vaginais não foram coletados por falta de meio de transporte no momento da coleta e 75 (27,3%) amostras (33 swabs vaginais e 42 swabs endocervicais) não foram coletadas porque as pacientes se recusaram a coletá-las. Embora as participantes tenham sido re-convocadas para uma nova coleta não compareceram aos postos para realizá-la.

Tabela 6. Percentual de participantes que não coletaram os três tipos de amostras biológicas (N=119).

Número de participantes (%)	Amostras não coletadas
22 (18,5%)	Swab vaginal e endocervical
17 (14,3%)	Swab endocervical
8 (6,7%)	Swab vaginal
5 (4,2%)	Urina
67 (56,3%)	Nenhuma amostra coletada

As prevalências das infecções clamidial e gonocócica foram estimadas considerando um resultado como verdadeiro positivo quando pelo menos duas das três amostras biológicas coletadas da mesma paciente fossem positivas. Dessa forma, 27 participantes apresentaram resultado verdadeiro-positivo para *C. trachomatis*, entre estas, 19 pacientes tiveram resultado positivo nos três espécimes biológicos e oito adolescentes apresentaram resultado positivo em duas das três amostras coletadas, observando-se prevalência de 8,7% (27/309). Em relação a *N. gonorrhoeae*, sete pacientes apresentaram resultado verdadeiro-positivo. Entre estas, apenas uma participante apresentou PCR positiva para o gonococo nos três espécimes biológicos e 6 tiveram resultado positivo em duas das três amostras, observando-se prevalência de 2,3% (7/309) para *N. gonorrhoeae*. A co-infecção por clamídia e gonococo foi observada em apenas uma paciente.

Considerando-se apenas um tipo de amostra, os percentuais de positividade para a *C. trachomatis* foram de 8,4% na urina, 10,7% no swab endocervical e de 9,7% no swab vaginal, sem diferença estatisticamente significativa observada entre as amostras. Em relação à infecção pela *N. gonorrhoeae*, o percentual de positividade variou de 1,0% na urina a 5,5% no swab vaginal. Ocorreram diferenças estatisticamente significantes entre os percentuais de positividade obtidos na urina e no swab endocervical ($p= 0,03$) e entre a urina e o swab vaginal ($p= 0,001$), porém não houve diferença significativa na positividade entre os dois tipos de swab ($p>0,05$). Os percentuais de positividade das infecções clamidial e gonocócica em cada amostra podem ser visualizados na tabela 7.

Tabela 7. Percentual de positividade das infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* nos três tipos de amostras biológicas analisadas (N=309).

Microrganismo	Amostras	PCR		Positividade (IC95%)
		+	-	
<i>C. trachomatis</i>				
	Urina	26	283	8,4% (5,7 - 12,2)
	Swab endocervical	33	276	10,7% (7,6 - 14,8)
	Swab vaginal	30	279	9,7% (6,7 - 13,7)
<i>N. gonorrhoeae</i>				
	Urina	3	306	1,0% (0,3 - 3,1)
	Swab endocervical	11	298	3,6% (1,9 - 6,5)
	Swab vaginal	17	292	5,5% (3,3 - 8,8)

5.3 Avaliação do desempenho da PCR na detecção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* empregando urina, swabs endocervical e vaginal

A tabela 8 mostra os valores da sensibilidade, especificidade, VPP e VPN da PCR utilizando cada espécime biológico considerando um resultado como verdadeiro positivo quando pelo menos duas amostras fossem positivas. Todas as amostras tiveram sensibilidade superior a 80% na detecção da *C. trachomatis*, porém o swab endocervical foi o mais sensível (96,3%), seguido pelo swab vaginal (92,6%). A especificidade da PCR empregando os três tipos de amostra foi elevada variando de 97,5% a 98,6%. Em relação à infecção por *N. gonorrhoeae*, a urina foi pouco sensível (42,8%). Em contraste, o swab vaginal apresentou 100% de sensibilidade e o swab endocervical, 71,4%. As especificidades observadas foram de 100% na urina, 98% no swab endocervical e 96,7% no swab vaginal.

A urina obteve o maior VPP tanto na detecção da clamídia (84,6%) como do gonococo (100%). O swab endocervical teve o menor VPP (78,8%) na pesquisa da

infecção clamidial devido ao maior número de casos falso-positivos. Os VPPs dos swabs vaginal e endocervical na detecção do gonococo foram de apenas 41,2% e 45,4%, respectivamente, mostrando que ambas as amostras falharam em identificar os resultados verdadeiros positivos e apresentaram grande número de resultados falso-positivos. Os VPNs de todas as amostras foram superiores a 98% na detecção dos dois microrganismos.

Tabela 8. Desempenho da PCR no diagnóstico de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* empregando as amostras de urina, swabs endocervical e vaginal (N=309).

Microrganismo	Amostras	Verdadeiro-positivo^a	Falso-positivo	Falso-negativo	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
<i>C. trachomatis</i>	Urina	22	4	5	22/27 (81,5)	278/282 (98,6)	22/26 (84,6)	278/283 (98,2)
	SE	26	7	1	26/27 (96,3)	275/282 (97,5)	26/33 (78,8)	275/276 (99,6)
	SV	25	5	2	25/27 (92,6)	277/282 (98,2)	25/30 (83,3)	277/279 (99,3)
<i>N. gonorrhoeae</i>	Urina	3	0	4	3/7 (42,8)	302/302 (100)	3/3 (100)	302/306 (98,7)
	SE	5	6	2	5/7 (71,4)	296/302 (98,0)	5/11 (45,4)	296/298 (99,3)
	SV	7	10	0	7/7 (100)	292/302 (96,7)	7/17 (41,2)	292/292 (100)

^a – Resultados positivos em pelo menos duas amostras biológicas; **SV** – Swab Vaginal; **SE** – Swab Endocervical; **VPP** – Valor Preditivo Positivo; **VPN** – Valor Preditivo Negativo

5.4 Análise de concordância de resultados entre as três amostras biológicas analisadas

A concordância observada de resultados foi elevada entre os três espécimes biológicos. Os resultados das amostras concordaram em 19 casos positivos para *C. trachomatis* e em 266 casos negativos, observando-se uma concordância de 92,2%. Em relação à *N. gonorrhoeae*, a concordância observada foi de 93,2%. As amostras concordaram em um caso positivo para o gonococo e em 287 casos negativos. Os resultados discrepantes entre as amostras foram de 24 para clamídia e 22 para o gonococo.

Avaliando-se as amostras duas a duas (tabela 9) foi observado que os resultados da urina e do swab endocervical concordaram em mais de 94% dos casos na detecção da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae*. As concordâncias observadas entre os resultados do swab vaginal e das amostras de urina e swab endocervical foram também superiores a 94% na pesquisa dos dois microrganismos.

Na detecção da infecção clamidial, o coeficiente de concordância ajustada (kappa - κ) mostrou concordância substancial entre quaisquer pares de amostras comparadas. O kappa foi de 0,68 entre a urina e o swab endocervical e entre a urina e o swab vaginal, e foi ligeiramente superior entre os dois tipos de swab (0,73). Quanto à infecção por *N. gonorrhoeae*, o valor do κ mostrou fraca concordância entre a urina e o swab endocervical (0,13). Em relação aos outros pares de amostras comparadas, o kappa mostrou razoável concordância entre as amostras de urina e swab vaginal (0,29) e entre os dois tipos de swab (Landis & Koch 1977).

Tabela 9. Concordância de resultados entre as três amostras biológicas analisadas na detecção das infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* (N=309).

Microrganismos	Amostras	Concordância Observada	+/+	Discrepâncias		Kappa (IC95%)
				+/-	-/+	
<i>C. trachomatis</i>	SE x URINA	94,5%	21	12	5	0,68 (0,57 – 0,79)
	SE x SV	95,1%	24	9	6	0,73 (0,62 – 0,84)
	URINA x SV	94,8%	20	6	10	0,68 (0,57 – 0,79)
<i>N. gonorrhoeae</i>	SE x URINA	96,1%	1	10	2	0,13 (0,04 – 0,22)
	SE x SV	94,2%	5	6	12	0,33 (0,22 – 0,44)
	URINA x SV	95,5%	3	0	14	0,29 (0,21 – 0,37)

SV – Swab Vaginal; **SE** – Swab Endocervical; **IC** – Intervalo de Confiança

6 DISCUSSÃO

O presente estudo empregou amostras de urina, swab endocervical e swab vaginal no diagnóstico molecular de infecções por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, utilizando o kit comercial AMPLICOR CT/NG (Roche). Foram avaliados o desempenho dos testes e a concordância dos resultados obtidos com as diferentes amostras com o objetivo de avaliar a utilização do swab vaginal em estudos epidemiológicos.

Foram recrutadas 651 adolescentes e jovens do sexo feminino. Cerca de 65% (428) das participantes eram sexualmente ativas e entre estas, 309 coletaram os três tipos de amostra e foram incluídas no estudo. As prevalências das infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* foram estimadas considerando-se um resultado verdadeiro-positivo quando pelo menos duas das três amostras biológicas da mesma paciente fossem positivas. Assim, foram observadas prevalências das infecções clamidial e gonocócica de 8,7% (IC95% 5,8 - 12,4) e 2,3% (IC95% 0,9 - 4,6), respectivamente.

Alguns estudos realizados no Brasil encontraram prevalências ligeiramente maiores da infecção clamidial que variaram de 12,2% (IC95% 9,4 - 17,0) a 13,5% (IC95% 9,5 - 18,4) em amostras de urina de adolescentes e mulheres jovens atendidas em postos do PSF ou em clínicas de planejamento familiar (Miranda et al. 2004, Codes et al. 2006, Fernandes et al. 2009). Apenas o estudo de Araújo et al. (2006) relatou prevalência da infecção por *C. trachomatis* significativamente superior (17,6%, IC95% 12,9 - 23,6) ($p < 0,05$) em amostras de swab endocervical coletadas de adolescentes e jovens de 15 a 24 anos não grávidas residentes no município de Goiânia. Possivelmente a maior prevalência observada se explica pelo fato de que parte da população do estudo foi recrutada em ambiente clínico entre pacientes atendidas em uma clínica ginecológica para adolescentes e para planejamento familiar. Em relação à infecção gonocócica, os estudos evidenciaram prevalências que variaram de 1,9% (IC95% 1,1 - 2,7) a 3,2% (IC95% 1,2 - 7,0) em amostras de urina, portanto, semelhantes à encontrada neste trabalho ($p > 0,05$) (Miranda et al. 2004, Codes et al. 2006, Fernandes et al. 2009).

Tanto a urina como os swabs endocervical e vaginal mostraram alta sensibilidade (81,5% a 96,3%) e especificidade (>97%) para a *C. trachomatis* o que explica a semelhança dos percentuais de positividade encontrados em cada amostra. Chandeying et al. (2002), Knox et al. (2002) e Schachter et al. (2003) encontraram

sensibilidades superiores a 71,4% e especificidades superiores a 98,8% nos três tipos de amostras também utilizando o kit AMPLICOR CT/NG (Roche), sendo similares às encontradas neste estudo. Todos os estudos mostram que o swab vaginal pode ser semelhante à urina e ao swab endocervical na identificação da infecção clamidial. O bom desempenho do swab vaginal pode ser explicado pela alta carga bacteriana encontrada neste tipo de amostra, podendo inclusive ser superior à encontrada na urina como evidenciado no estudo de Michel et al. (2007).

Quanto à infecção por *N. gonorrhoeae*, as diferenças estatisticamente significantes observadas entre os percentuais de positividade obtidos pelas amostras sugerem que os swabs endocervical e vaginal são melhores que a urina na detecção da infecção. De fato, a sensibilidade da urina foi de apenas 42,8%. Outros autores como Tshibaka et al. (2000) e Knox et al. (2002) também encontraram baixas sensibilidades da urina na detecção do gonococo que foram de 53,8% e 31,2%, respectivamente, com o uso do kit AMPLICOR CT/NG (Roche).

Knox et al. (2002) sugerem que o longo tempo de transporte e armazenamento, além de substâncias inibidoras presentes na urina podem reduzir a sensibilidade desta amostra na detecção do gonococo. No presente estudo, todos os testes foram realizados na presença do controle interno e as amostras que inicialmente apresentavam inibição eram diluídas e retestadas e, por isso, a baixa sensibilidade da urina na detecção da *N. gonorrhoeae* não pode ser atribuída à presença de substâncias inibidoras nestas amostras. Quanto ao armazenamento, o longo tempo de congelamento até o processamento da amostra, superior aos dois meses recomendados pelo fabricante, pode ter sido um dos fatores que afetaram o desempenho da urina na detecção do gonococo. Entretanto, no estudo de Tshibaka et al. (2000) não foram observadas diferenças significativas entre as sensibilidades das amostras de urina analisadas após diferentes períodos de armazenamento (<6 meses, 41,7%; entre 6 e 9 meses, 46,7%; ou > 9 meses, 63,2%). Os autores sugerem que o congelamento e descongelamento repetido da urina para realização da PCR, o que não ocorreu no presente estudo, pode ter um impacto negativo na sensibilidade. Além disso, estes autores questionam a possibilidade da uretra feminina não ser o principal local de infecção do microrganismo, em contraste com a infecção masculina, na qual a urina e o swab uretral têm apresentado altas sensibilidades e especificidades para o gonococo utilizando-se o kit AMPLICOR CT/NG (Roche) (Chan et al. 2000, van Doornum et al. 2001).

Curiosamente, com relação à *C. trachomatis* o longo tempo de armazenamento não afetou a sensibilidade da urina na detecção desta infecção. De acordo com a experiência do nosso laboratório, amostras de urina positivas para *C. trachomatis* permaneceram positivas após mais de quatro anos de congelamento a menos 80°C. Em contraste, Puolakkainem et al. (1998) ao retestarem amostras de urina positivas para *C. trachomatis* que ficaram armazenadas a menos 20°C por 6 meses observaram que 10 das 78 amostras positivas negativaram-se. Os autores sugerem que o longo tempo de congelamento pode degradar a molécula de DNA bacteriana presente na amostra. Provavelmente, o congelamento em temperatura mais baixa tenha evitado a degradação do DNA clamidial no presente estudo.

Diferente da urina, o swab vaginal apresentou 100% de sensibilidade para a infecção gonocócica que foi equivalente ao resultado encontrado no estudo de Masek et al. (2009) tanto utilizando o kit AMPLICOR CT/NG (Roche) como o kit APTIMA Combo 2 (Gen-Probe). Esta alta sensibilidade foi também observada por Cosentino et al. (2003) e Fang et al. (2008) que utilizaram o kit BDProbeTec. Em contraste, a sensibilidade do swab endocervical foi menor (71,4%) em comparação aos estudos de Tshibaka et al. (2000), van Doornum et al. (2001) e Knox et al. (2002) empregando o kit AMPLICOR-Roche, além de ter sido inferior às sensibilidades encontradas por autores que utilizaram outros kits diagnósticos (Cosentino et al. 2003, Gaydos et al. 2003, Schachter et al. 2005, Fang et al. 2008). Este foi um resultado inesperado uma vez que a infecção gonocócica se dá principalmente no epitélio cervical feminino (Follows et al. 2009). O desempenho do swab endocervical pode ter sido influenciado pelo fato desta amostra ter sido coletada após o material para realização do exame citológico preventivo e isso pode ter diminuído a carga bacteriana de *N. gonorrhoeae* desta amostra. Porém, a sensibilidade do swab endocervical na detecção de *C. trachomatis* não foi alterada pela seqüência da coleta das amostras tendo apresentado, inclusive, a maior sensibilidade observada entre os três tipos de amostras.

Quanto à especificidade, tanto a urina como os swabs endocervical e vaginal foram altamente específicos para o gonococo (>96%), resultados semelhantes aos de outros estudos que utilizaram o kit AMPLICOR CT/NG (Roche) (Chan et al. 2000, Farrel & Sheedy 2001, van Doornum et al. 2001, Masek et al. 2009). Certamente, isso se deve à menor prevalência da infecção gonocócica e conseqüentemente ao maior número de casos verdadeiro-negativos na população estudada. Entretanto, apesar dos swabs endocervical e vaginal terem mostrado alta especificidade na pesquisa da *N.*

gonorrhoeae eles apresentaram grande número de resultados falso-positivos que se refletiram em menores VPPs nestas amostras que foram de 45,4% e 41,2%, respectivamente. Em contraste, a urina que teve 100% de especificidade apresentou também VPP de 100%, devido à ausência de resultados falso-positivos nesta amostra.

Vários autores já evidenciaram baixos VPPs para a infecção gonocócica em amostras urogenitais utilizando o kit AMPLICOR CT/NG (Roche) que decorreram da presença do elevado número de resultados falso-positivos (Chan et al. 2000, Farrell & Sheedy 2001, van Doornum et al. 2001, Diemert et al. 2002, Masek et al. 2009). Os resultados falso-positivos podem estar associados à reação cruzada entre espécies de *Neisseria* comensais não gonocócicas e outras bactérias que podem ser detectadas pela PCR, como exemplo, espécies do gênero *Lactobacillus* (van Doornum et al. 2001, Whiley et al. 2006). No estudo de Farrell (1999) foram observadas reações cruzadas com *N. subflava* e *N. cinerea* e Palmer et al. (2003) evidenciaram reações cruzadas com as espécies de *N. flavescens*, *N. lactamica* e *N. sicca* isoladas de amostras oriundas da região genital. Esta hipótese não pode ser confirmada em nosso estudo, uma vez que não identificamos outras espécies de *Neisseria* nas amostras.

Em relação à *C. trachomatis*, os VPPs variaram de 78% no swab endocervical a 84,6% na urina. O número de casos falso-positivos não foi suficiente para reduzir drasticamente os VPPs das amostras devido à maior prevalência da infecção clamidial e conseqüentemente da maior quantidade de resultados verdadeiro-positivos. Os autores que também utilizaram o kit AMPLICOR (CT/NG) (Roche) encontraram VPPs para clamídia ligeiramente maiores nos diferentes tipos de amostras, sendo mais evidente esta diferença em relação ao swab endocervical. Isto pode ter sido decorrente das prevalências um pouco mais elevadas da infecção clamidial encontradas nestes estudos que variaram de 9,2% a 12,9%, além da menor quantidade de resultados falso-positivos (Chan et al. 2000, van Doornum et al. 2000, Knox et al. 2002, Masek et al. 2009).

Devido à possibilidade da ocorrência de resultados falso-positivos e do baixo VPP de alguns NAATs na pesquisa da *N. gonorrhoeae* o CDC recomenda que os resultados presumivelmente positivos para o microrganismo sejam retestados utilizando o mesmo kit ou um kit diferente para a confirmação do diagnóstico (CDC 2002). Porém, o resultado falso-positivo pode permanecer mesmo com a repetição do teste e por isso Whiley et al. (2006) sugerem que o reteste seja feito com um NAAT diferente e que detecte outra sequência alvo do microrganismo. Isto pode ter sido uma limitação do nosso estudo uma vez que as amostras positivas foram retestadas com o mesmo NAAT,

pois a importação de outro kit seria economicamente inviável e não temos, até o momento, outro kit de PCR para clamídia e gonococo comercializado no Brasil.

Os VPNs da urina e dos swabs endocervical e vaginal foram superiores a 98% na detecção das infecções clamidial e gonocócica e são semelhantes aos encontrados nos estudos de Chan et al. (2000), Tshibaka et al. (2000), van Doornum et al. (2001), Knox et al. (2002), Masek et al. (2009) e de outros autores que utilizaram outros tipos de NAATs (Cosentino et al. 2003, Gaydos et al. 2003, Fang et al. 2008). Estes valores estão associados à pequena quantidade de casos falso-negativos detectados nos três espécimes biológicos.

Quanto à análise da concordância observada, foi evidenciado que as três amostras concordaram em mais de 92% dos resultados na detecção da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae*. Comparando as amostras duas a duas as concordâncias foram superiores a 94% em qualquer um dos pares analisados para ambas as infecções. Hoebe et al. (2006) e Fang et al. (2008) observaram resultados semelhantes que foram superiores a 98% e 97%, respectivamente, com o NAAT BDProbeTec. Os altos índices de concordância se devem principalmente ao grande número de resultados negativos 100% concordantes entre a urina e os swabs endocervical e vaginal. Quanto à positividade, os três espécimes biológicos apresentaram número considerável de resultados positivos discrepantes entre si e isto resultou em baixos valores do coeficiente kappa, principalmente em relação à infecção gonocócica.

Na pesquisa da *C. trachomatis*, os coeficiente de concordância ajustada (kappa) variaram de 0,68 a 0,73 evidenciando concordância substancial entre a urina e os swabs endocervical e vaginal. Em relação à infecção gonocócica, a concordância entre as amostras foi fraca ou razoável devido aos baixos valores do kappa que variaram de 0,13 a 0,33. Fang et al. (2008) encontraram valores de kappa superiores a 0,83 entre estas amostras tanto na detecção da infecção clamidial como da gonocócica empregando o kit BDProbeTec. Embora tenha ocorrido grande quantidade de resultados positivos discrepantes entre as amostras, os valores do kappa não foram afetados devido ao elevado número de resultados positivos concordantes, já que as prevalências observadas por estes autores, 26,6% para *C. trachomatis* e 11,7% para *N. gonorrhoeae*, foram significativamente superiores às prevalências estimadas em nosso estudo. Estas maiores prevalências se devem principalmente às características da população estudada que foi composta por 96% de adolescentes americano-africanas com 12 a 18 anos de idade que

em média iniciaram a vida sexual aos 14 anos e tiveram cerca de quatro parceiros sexuais, evidenciando comportamento de alto risco para a aquisição de DST.

Os três tipos de amostras apresentaram bom desempenho e substancial concordância na pesquisa da infecção por *C. trachomatis*. Quanto à infecção por *N. gonorrhoeae*, foi evidenciado que a urina e os swabs endocervical e vaginal apresentaram baixo desempenho e concordância. Possivelmente isto não esteja relacionado às amostras biológicas empregadas e sim ao NAAT AMPLICOR CT/NG (Roche) que tem apresentado baixa sensibilidade para *N. gonorrhoeae* em diferentes amostras e ocorrência de resultados falso-positivos que resultam em baixo VPP do teste (Chan et al. 2000, Tshibaka et al. 2000, Knox et al. 2002, Masek et al. 2009).

Vários autores que utilizaram outro tipo de NAAT mostraram bom desempenho do swab vaginal na detecção do gonococo, sendo comparável ao desempenho do swab endocervical e da urina (Hook et al. 1997a, Garrow et al. 2002, Cosentino et al. 2003, Fang et al. 2008, Masek et al. 2009). A maioria destes autores encontrou prevalências mais elevadas da infecção gonocócica (7,6% a 17,5%) do que à encontrada no presente estudo e isto pode ter contribuído para o bom desempenho do swab vaginal. Estas elevadas prevalências se devem às características das populações recrutadas nestes estudos que são de alto risco para a aquisição de DST, como exemplos, pacientes sintomáticos atendidos em clínica de DST, adolescentes americano-africanas e pacientes convidadas em ambiente clínico que realizavam exame ginecológico por algum motivo (Hook et al. 1997a, Garrow et al. 2002, Cosentino et al. 2003, Fang et al. 2008). A maior prevalência da infecção aumenta o VPP do teste reduzindo assim o número de casos falso-positivos. O grande número de resultados falso-positivos foi o principal fator que influenciou no baixo desempenho do swab vaginal na pesquisa da infecção gonocócica em nosso estudo.

No estudo de Masek et al. (2009) embora a prevalência estimada da infecção gonocócica seja de apenas 1,0% o swab vaginal apresentou sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de 100% para a infecção gonocócica com o NAAT GenProbe APTIMA™ Combo 2. Golden et al. (2004) também encontraram alto VPP (97,4%) para o gonococo em uma população de baixa prevalência da infecção (0,47%) utilizando o mesmo kit em amostras de urina e swab endocervical. Estes estudos mostram a superioridade do kit GenProbe APTIMA™ Combo 2 na identificação da infecção por *N. gonorrhoeae* com diferentes tipos de amostras, incluindo o swab vaginal. Chernesky et al. (2006) sugerem que o melhor desempenho

deste kit pode estar associado com a maior quantidade de RNA alvo presente nas amostras quando comparada ao número de moléculas de DNA amplificadas pelos outros kits.

Apesar da menor sensibilidade da urina, comparada aos swabs endocervical e vaginal, na detecção das infecções clamidial e gonocócica evidente em nosso estudo e nos de Knox et al. (2002) e Schachter et al. (2003) esta amostra tem sido extensivamente utilizada na triagem destas DST e é a única amostra de coleta não invasiva autorizada pela FDA para uso fora do ambiente clínico. A validação do uso do swab vaginal pode ser uma alternativa à urina e ao swab endocervical em locais onde as condições sociais não dão suporte adequado para a realização de estudos epidemiológicos das DST, como boas condições de armazenamento para a urina ou a disponibilidade de um profissional capacitado para a realização do exame pélvico e coleta do swab endocervical.

Soma-se a isso a boa aceitabilidade do swab vaginal pela paciente. No estudo de Chernesky et al. (2005) foi observado que as mulheres preferem coletar o próprio swab vaginal a coletarem urina ou serem examinadas por um clínico e 94% das pacientes entrevistadas disseram que realizariam com maior frequência o diagnóstico de clamídia e neisseria com a utilização do swab vaginal. Além disso, Schachter et al. (2003) demonstraram que os resultados obtidos pela análise do swab vaginal coletado por um clínico ou pela paciente são equivalentes indicando que as participantes podem coletar eficientemente a própria amostra eliminando assim, os gastos com a visita ao clínico e com o exame pélvico. Entretanto, as pacientes devem ser conscientizadas de que a coleta do swab vaginal ou da urina não substituem o exame pélvico, que inclui a inspeção visual da região genital além da realização dos exames preventivos que devem ser feitos periodicamente.

Em resumo, o presente estudo evidenciou que os três tipos de amostras biológicas podem ser equivalentes na detecção da *C. trachomatis* sugerindo que o swab vaginal pode ser usado em estudos epidemiológicos da infecção clamidial. Entretanto, nossos resultados indicam que a urina e os dois tipos de swab não são equivalentes na detecção da *N. gonorrhoeae*, possivelmente devido ao tipo de NAAT utilizado que em outros estudos não mostrou bom desempenho no rastreamento desta infecção.

7 CONCLUSÕES

- As amostras de urina, swabs endocervical e vaginal tiveram bom desempenho na detecção da infecção clamidial, pois apresentaram alta sensibilidade, especificidade, VPP e VPN empregando o NAAT AMPLICOR CT/NG.
- Na pesquisa da infecção gonocócica a urina e o swab endocervical não mostraram sensibilidade satisfatória e apesar do swab vaginal ter sido altamente sensível e específico ele apresentou baixo VPP para a infecção. Portanto, sua utilização nos estudos epidemiológicos da infecção gonocócica deve ser cuidadosamente avaliada, principalmente quando a população for de baixa prevalência.
- Na pesquisa de *C. trachomatis* houve boa concordância de resultados entre as amostras indicando que a urina e os swabs endocervical ou vaginal são equivalentes no diagnóstico desta infecção e sugerindo que o swab vaginal pode ser usado em estudos epidemiológicos.
- Em relação à infecção por *N. gonorrhoeae*, este estudo mostrou que a urina e os dois tipos de swab não identificaram os mesmos resultados positivos sugerindo que estas amostras não são equivalentes para estudos epidemiológicos desta infecção. Possivelmente estas discrepâncias não estejam associadas às amostras biológicas empregadas e sim ao NAAT AMPLICOR CT/NG.

REFERÊNCIAS

- Akduman D, Ehret JM, Messina K, Ragsdale S, Judson FN 2002. Evaluation of a strand displacement amplification assay (BD ProbeTec-SDA) for detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens. *J Clin Microbiol* 40: 281-283.
- Alcaraz I, Bello M, Bello PQ, T, Feitosa I, Broutet N, Salamon R: Prevalência das etiologias de corrimento vaginal nas mulheres atendidas em consultas de ginecologia-DST em Fortaleza/Ceará., I Fórum e II Conferência Técnica Horizontal da América Latina e do Caribe em HIV/AIDS e DST, Brasília-DF, 2000, pp. p.240.
- ANVISA 2010. Consulta de produto: GenProbe Aptima Combo 2. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto_correlato/consulta_correlato.asp.
Data de acesso: 25/11/2010.
- Apicella MA, Shero M, LarvisGA, Griffiss JM, Mandrell RE, Schneider H 1987. Phenotypic variation in epitope expression of the *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharide. *Infec Immun* 55: 1755-1761.
- Apicella MA, Ketterer M, Lee FK, Zhou D, Rice PA, Blake MS 1996. The pathogenesis of gonococcal urethritis in men: confocal and immunoelectron microscopic analysis of urethral exudates from men infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *J Infect Dis* 173: 636–46.
- Araújo RS, Guimarães EM, Alves MF, Sakurai E, Domingos LT, Fioravante FC, Machado AC 2006. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25: 397-400.
- Ayala P, Lin L, Hopper S, Fukuda M, So M 1998. Infection of epithelial cells by pathogenic *Neisseria* reduces the levels of multiple lysosomal constituents. *Infec Immun* 66: 5001-5007.

Bebear C, Barbeyrac B 2009. Genital *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Infect* 15: 4-10.

Berton G, C Laudanna, C Sorio, F Rossi 1992. Generation of signals activating neutrophil functions by leukocyte integrins: LFA-1 and gp150/95, but not CR3, are able to stimulate the respiratory burst of human neutrophils. *J Cell Biol* 116: 1007-1017.

Berwald N, Cheng S, Augenbraun M, Abu-Lawi K, Lucchesi M, Zehtabchi S 2009. Self-administered vaginal swabs are a feasible alternative to physician-assisted cervical swabs for sexually transmitted infection screening in the emergency department. *Acad Emerg Med* 16: 360-363.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK 2007. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19: 652-657.

Bignell C, Ison A, Jungmann 2006. Gonorrhoea. *Sex Transm Infect* 82: 6-9.

Binnicker MJ, Williams RD, Apicella MA 2003. Infection of human urethral epithelium with *Neisseria gonorrhoeae* elicits an upregulation of host anti-apoptotic factors and protects cells from staurosporine-induced apoptosis. *Cell Microbiol* 5: 549-560.

Bjerknes R, Guttormsen HK, Solberg CO, Wetzler LM 1995. *Neisserial* porins inhibit human neutrophil actin polymerization, degranulation, opsonin receptor expression, and phagocytosis but prime the neutrophils to increase their oxidative burst. *Infect Immun* 63: 160-167.

Black CM, Marrazzo J, Johnson RE, Hook EW, Jones RB, Green TA, Schachter J, Stamm WE, Bolan G, Louis ME, Martins DH 2002. Head-to-head multicenter comparison of DNA probe and nucleic acid amplification tests for *Chlamydia trachomatis* infection in women performed with an improved reference standard. *J Clin Microbiol* 40: 3757-3763.

Bos MP, Kuroki M, Krop-Watorek A, Hogan D, Belland RJ 1998. CD66 receptor specificity exhibited by neisserial Opa variants is controlled by protein determinants in CD66 N-domains. *Proc Natl Acad Sci*95: 9584–9589.

Brunham RC, Rey-Ladino J 2005. Immunology of *Chlamydia* infections: implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nature Reviews* 5: 149-161.

Buchholz KR, Stephens RS 2006. Activation of the host cell proinflammatory interleukin-8 response by *Chlamydia trachomatis*. *Cell Microbiol* 8: 1768-1779.

CDC 2002. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *MMWR* 51.

CDC 2006. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/treatment/2006/rr5511.pdf>. Data de Acesso: 12/07/2010.

CDC 2007. Fact Sheet Gonorrhea. Content Update. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/gonorrhea-fact-sheet.pdf>. Data de acesso: 17/06/2010.

CDC 2009a. Sexually Transmitted Disease Surveillance. Chlamydia Prevalence Monitoring Project. Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/Chlamydia2007/CTSurvSupp2007Short.pdf>. Data de acesso: 08/06/2010.

CDC 2009b. Sexually Transmitted Disease Surveillance. Gonococcal Isolate Surveillance Project (GISP). Disponível em: <http://www.cdc.gov/std/gisp2007/GISPSurvSupp2007Short.pdf>. Data de acesso: 08/06/2010.

Chan EL, Brandt K, Olienus K, Antonishyn N, Horsman GB 2000. Performance characteristics of the Becton Dickinson ProbeTec System for direct detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in male and female urine specimens in comparison with the Roche Cobas System. *Arch Pathol Lab Med* 124: 1649–1652.

Chandeying V, Skov S, Farrel D, Lamlertkittikul S, Lamlertkittikul P, Tabrizi S, Pradutkanchana JJ, Jarumanokul R, Suddeaugrai O 2002. A comparison of first-void urine, self-administered low vaginal swab, self-inserted tampon, and endocervical swab using PCR tests for the detection of infection with *Chlamydia trachomatis* in commercial sex workers and women attending gynecology outpatients in southern Thailand. *Thai J Obstet Gynaecol* 14: 201-209.

Chernesky MA 2005. The laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 16: 39-44.

Chernesky MA, Hook EW, Martin DH, Lane J, Johnson R, Jordan JA, Fuller D, Willis D, Fine PM, Janda WM, Schachter J 2005. Women Find It Easy and Prefer to Collect Their Own Vaginal Swabs to Diagnose *Chlamydia trachomatis* or *Neisseria gonorrhoeae* Infections. *Sex Trans Dis* 32:729-733.

Chernesky MA, Jang D, Luinstra K, Chong S, Smieja M, Cai W, Hayhoe B, Portillo E, MacRitchie C, Main C, Ewert R 2006. High analytical sensitivity and low rates of inhibition may contribute to detection of *Chlamydia trachomatis* in significantly more women by the APTIMA Combo 2 Assay. *J Clin Microbiol* 44: 400-405.

Codes JS, Cohen DA, de Melo NA, Teixeira GG, Leal Ados S, Silva Tde J, de Oliveira MP 2006. Screening of sexually transmitted diseases in clinical and non-clinical settings in Salvador, Bahia, Brazil. *Cad Saude Publica* 22: 325-334.

Cohen IR 1967. Natural and immune human antibodies reactive with antigens of virulent *Neisseria gonorrhoeae*: immunoglobulins G, M, and A. *J Bacteriol* 94: 141-148.

Cohen MS, Cannon JG 1999. Human experimentation with *Neisseria gonorrhoeae*: progress and goals. *J Infect Dis* 179: 375-379.

Cosentino LA, Landers DV, Hillier SL 2003. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by strand displacement amplification and relevance of the

amplification control for use with vaginal swab specimens. *J Clin Microbiol* 41: 3592-3596.

Dautry-Varsat A, Subtil A, Hackstadt T 2005. Recent insights into the mechanisms of *Chlamydia* entry. *Cell Microbiol* 7: 1714-1722.

Davis CH, Wyrick PB 1997. Differences in the association of *Chlamydia trachomatis* serovar E and serovar L2 with epithelial cells in vitro may reflect biological differences in vivo. *Infect Immun* 65: 2914-2924.

Diemert DJ, Libman MD, Lebel P 2002. Confirmation by 16S rRNA PCR of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 40: 4056-4059.

Donovan B 2004. Sexually transmissible infections other than HIV. *Lancet* 363: 545-556.

Edwards JL, Shao JQ, Ault KA, Apicella MA 2000. *Neisseria gonorrhoeae* elicits membrane ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells. *Infect Immun* 68: 5354-5363.

Edwards JL, Brown EJ, Ault KA, Apicella MA 2001. The role of complement receptor 3 (CR3) in *Neisseria gonorrhoeae* infection of human cervical epithelia. *Cell Microbiol* 3: 611-622.

Edwards JL, Apicella MA 2002. The role of lipooligosaccharide in *Neisseria gonorrhoeae* pathogenesis of cervical epithelia: lipid A serves as a C3 acceptor molecule. *Cell Microbiol* 4: 585-598.

Edwards JL, Brown EJ, Uk-Nham S, Cannon JG, Blake MS, Apicella MA 2002. A cooperative interaction between *Neisseria gonorrhoeae* and complement receptor 3 mediates infection of primary cervical epithelial cells. *Cell Microbiol* 4: 571-584.

Edwards JL, Apicella MA 2004. The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. *Clin Microbiol* 17: 965-981.

Fang J, Husman C, DeSilva L, Chang R, Peralta L 2008. Evaluation of self-collected vaginal swab, first void urine and endocervical swab specimens for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in adolescent females. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 21: 355-360.

Fang L, Oliver A, Jayaraman GC, Wong T 2010. Trends in age disparities between younger and middle-age adults among reported rates of chlamydia, gonorrhea, and infectious syphilis infections in Canada: findings from 1997 to 2007. *Sex Transm Dis* 37: 18-25.

Farrell DJ 1999. Evaluation of AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR using *cppB* nested PCR and 16S rRNA PCR. *J Clin Microbiol* 37: 386–390.

Farrell DJ, Sheedy TJ 2001. Urinary screening for *Neisseria gonorrhoeae* in asymptomatic individuals from Queensland, Australia: an evaluation using three nucleic acid amplification methods. *Pathology* 33: 204–220.

Feinen B, Jerse AE, Gaffen SL, Russell MW 2010. Critical role of Th17 responses in a murine model of *Neisseria gonorrhoeae* genital infection. *Mucos Immunol* 3: 312-321.

Fernandes AM, Daher G, Nuzzi RX, Petta CA 2009. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among women in a family planning clinic. *Rev Bras Ginecol Obstet* 31: 235-240.

Fichorova RN, Desai PJ, Gibson FC, Genco CA 2001. Distinct proinflammatory host responses to *Neisseria gonorrhoeae* infection in immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. *Infect Immun* 69: 5840–5848.

Fioravante FC, Alves MFC, Guimarães EM, Turchi MD, Freitas HA, Domingos LT 2005. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* in asymptomatic Brazilian military conscripts. *Sex Transm Dis* 32: 165-169.

Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, Klos A, Hess S, Ying S, Hacker G 2004. Chlamydia inhibit host cell apoptosis by degradation of pro-apoptotic BH3-only proteins. *J Exp Med* 200: 905-916.

Follows SA, Murlidharan J, Massari P, Wetzler LM, GencoCA 2009. Neisseria gonorrhoeae infection protects human endocervical epithelial cells from apoptosis via expression of host antiapoptotic proteins. *Infect Immun* 77: 3602-3610.

Forhan SE, Gottlieb SL, Sternberg MR, Xu F, Datta SD, McQuillan GM, Berman SM, Markowitz LE 2009. Prevalence of sexually transmitted infections among female adolescents aged 14 to 19 in the United States. *Pediatrics* 124: 1505-1512.

Freidank HM, Billing H, Wiedmann-Al-Ahmad M 2001. Influence of iron restriction on *Chlamydia pneumonia* and *C. trachomatis*. *J Med Microbiol* 50: 223-227.

Garrow SC, Smith DW, Harnett GB 2002. The diagnosis of chlamydia, gonorrhoea, and trichomonas infections by self obtained low vaginal swabs, in remote northern Australian clinical practice. *Sex Transm Infect* 78: 278-281.

Gaydos CA, Quinn TC, Willis D, Weissfeld A, Hook EW, Martin DH, Ferrero DV, Schachter J 2003. Performance of the APTIMA Combo 2 assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *J Clin Microbiol* 41: 304-309.

GaydosCA, Theodore M, Dalesio N, Wood BJ, Quinn TC 2004. Comparison of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens. *J Clin Microbiol* 42: 3041-3045.

George JA, Panchatcharam TS, Paramasivam R, Balasubramanian S, Chakrapani V, Murugan G 2003. Evaluation of diagnostic efficacy of PCR methods for *Chlamydia*

trachomatis infection in genital and urine specimens of symptomatic men and women in India. *Jpn J Infect Dis* 56: 88-92.

Golden MR, Hughes JP, Cles LE, Crouse K, Gudgel K, Hu J, Swenson PD, Stamm WE, Handsfield HH 2004. Positive predictive value of Gen-Probe APTIMA Combo2 testing for *Neisseria gonorrhoeae* in a population of women with low prevalence of *N. gonorrhoeae* infection. *Clin Infect Dis* 39: 1387–1390.

Grassmé H, Gulbins E, Brenner B, Ferlinz K, Sandhoff K, Harzer K, Lang F, Meyer TF 1997. Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell* 91: 605-615.

Gray-Owen SD, Dehio C, Haude A, Grunert F, Meyer TF 1997. CD66 carcinoembryonic antigens mediate interactions between Opa-expressing *Neisseria gonorrhoeae* and human polymorphonuclear phagocytes. *EMBO J* 16: 3435–3445.

Gregg CR, Johnson AP, Taylor-Robinson D, Melly MA, McGee ZA 1981. Host species-specific damage to oviduct mucosa by *Neisseria gonorrhoeae* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 34: 1056–1058.

Griffiss JM, Lammel CJ, Wang J, Dekker NP, Brooks GF 1999. *Neisseria gonorrhoeae* coordinately uses pili and opa to activate HEC-1-B cells microvilli, which causes engulfment of the gonococci. *Infect Immun* 67: 3469-3480.

Gronowski AM, Copper S, Baorto D, Murray PR 2000. Reproducibility problems with the Abbott Laboratories LCx assay for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 38: 2416-2418.

Guimarães EM, GUIMARÃES Guimarães MD, Vieira MA, Bontempo NM, Seixas MS, Garcia MS, Daud LE, Cortês RL, Alves MF 2009. Lack of utility of risk score and gynecological examination for screening for sexually transmitted infections in sexually active adolescents. *BMC Med* 7:8.

Harvey HA, Ketterer MR, Preston A, Lubaroff D, Williams R, Apicella MA 1997. Ultrastructural analysis of primary human urethral epithelial cell cultures infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun*65: 2420–27.

Harvey HA, Jennings MP, Campbell CA, Williams R, Apicella MA 2001a. Receptor-mediated endocytosis of *Neisseria gonorrhoeae* into primary human urethral epithelial cells: the role of the asialoglycoprotein receptor. *Mol Microbiol*42: 659–672.

Harvey HA, Swords WE, Apicella MA 2001b. The mimicry of human glycolipids and glycosphingolipids in the lipooligosaccharides of pathogenic *Neisseria* and *Haemophilus*. *J Autoimmun*16: 257–262.

Harvey HA, Post DMB, Apicella MA 2002. Immortalization of human urethral epithelial cells: a model for the study of the pathogenesis of and the inflammatory cytokine response to *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Infect Immun*70: 5808–5815.

Hasty LA, Lambris JD, Lessey BA, Pruksananonda K, Lyttle CR 1994. Hormonal regulation of the complement components and receptors throughout the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*170: 168–175.

Hauck CR, Meyer TF, Lang F, Gulbins E 1998. CD66-mediated phagocytosis of *Opas₂Neisseria gonorrhoeae* requires a Src-like tyrosine kinase and Rac1-dependent signaling pathway. *EMBO* 17: 443–454.

Haugland S, Thune T, Fosse B, Wentzel-Larsen T, Hjelmevoll SO, Myrmel H 2010. Comparing urine samples and cervical swabs for Chlamydia testing in a female population by means of Strand Displacement Assay (SDA). *BMC Womens Health* 10: 1–6.

Hedges SR, Sibley DA, Mayo MS, Hook EW, Russell MW 1998. Cytokine and antibody response in women infected with *Neisseria gonorrhoeae*: effects of concomitant infections. *J Infect Dis*178: 742–751.

Hjelm E, Hallén A, Domeika M 2001. Cervical, urine and vaginal specimens for detection of *Chlamydia trachomatis* by ligase chain reaction in women: a comparison. *Acta Derm Venereol* 81: 285-288.

Ho MK, Lo JY, Lo AC, Cheng FK, Chan FK 2009. Evaluation of replacing the existing diagnostic strategy for *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections with sole molecular testing of urine specimens in a sexually transmitted infection clinic setting. *Sex Transm Infect* 85: 322-325.

Hobbs MM, van der Pol B, Totten P, Gaydos CA, Wald A, Warren T, Winer RL, Cook RL, Deal CD, Rogers ME, Schachter J, Holmes KK, Martin DH 2008. From the NIH: proceedings of a workshop on the importance of self-obtained vaginal specimens for detection of sexually transmitted infections. *Sex Transm Dis* 35: 8-13.

Hoebe CJP, Rademaker CW, Brouwers EEHG, Henriette LG, Waarbeek T, Van Bergen JAM 2006. Acceptability of self-taken vaginal swabs and first catch urine samples for the diagnosis of urogenital *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* with an amplified DNA assay in young women attending a public health sexually transmitted disease clinic. *Sex Transm Infect* 33: 491-495.

Holland-Hall CM, Wiesenfeld HC, Murray PJ 2002. Self-collected vaginal swabs for detection of multiple sexually transmitted infections in adolescent girls. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 15: 307-313.

Hook EW, Ching SF, Stephens J, Hardy KF, Smith KR, Lee HH 1997a. Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infections in women by using the ligase chain reaction on patient-obtained vaginal swabs. *J Clin Microbiol* 35: 2129-2132.

Hook EW, Smith K, Mullen C, Stephens J, Rinehardt L, Pate MS, Lee HH 1997b. Diagnosis of genitourinary *Chlamydia trachomatis* infections by using the ligase chain reaction on patient-obtained vaginal swabs. *J Clin Microbiol* 35: 2133-2135.

IBGE 2007. Estado de Goiás: População recenseada, por sexo e grupos de idade, segundo os municípios. Disponível em: <http://www.seplan.go.gov.br/sepin/pub/censo/tabela06.htm>. Data de acesso: 26/10/2010.

Igietseme JU, He Q, Joseph K, Eko FO, Lyn D, Ananaba G, Campbell A, Bandea C, Black CM 2009. Role of T lymphocytes in pathogenesis of *Chlamydia* disease. *J Infect Dis* 200: 926-934.

Ison CA, Hadfield SG, Bellinger CM, Dawson SG, Glynn AA 1986. The specificity of serum and local antibodies in female gonorrhoea. *Clin Exp Immunol* 65: 198–205.

Jalil EM, Pinto VM, Benzaken AS, Ribeiro D, Oliveira EC, Garcia EG, Moherdau F, Barbosa MJ 2008. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. *Rev Bras Ginecol Obstet* 30: 614-619.

Jendro MC, Fingerle F, Deutsch T, Liese A, Kohler L, Kuipers JG, Raum E, Martin M, Zeidler H 2004. *Chlamydia trachomatis*-infected macrophages induce apoptosis of activated T cells by secretion of tumor necrosis factor-alpha in vitro. *Med Microbiol Immunol* 193: 45-52.

Johnson RE, Green TA, Schachter J, Jones RB, Hook EW, Black CM, Martin DH, Louis ME, Stamm WE 2000. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men. *J Clin Microbiol* 38: 4382-4386.

Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB 1997. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 25: 639-647.

Kallstrom, H, Islam S, Berggren PO, Jonsson AB 1998. Cell signaling by the type IV pili of pathogenic *Neisseria*. *J Biol Chem* 273: 21777–21782.

Kallstron H, Gill DB, Albiger B, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB 2001. Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol* 3: 133-143.

Knox J, Tabrizi S, Miller P, Petoumenos K, Law M, Chen S, Garland SM 2002. Evaluation of Self-Collected Samples in Contrast to Practitioner- Collected Samples for Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis* by Polymerase Chain Reaction Among Women Living in Remote Areas. *Sex Trans Dis* 26: 647-654.

Kupsch EM, Knepper B, Kuroki T, Heuer I, Meyer TF 1993. Variable opacity (Opa) outer membrane proteins account for the cell tropism displayed by *Neisseria gonorrhoeae* for human leukocytes and epithelial cells. *EMBO J* 12: 641-650.

Landis JR, Koch GG 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33: 159-174.

Lee HSW, Ostrowski MA, Gray-Owen SD 2008. CEACAM1 dynamics during *Neisseria gonorrhoeae* suppression of CD4⁺ T lymphocyte activation. *J Immunol* 180: 6827-6835.

Levett PN, Brandt K, Olenius K, Brown C, Montgomery K, Hornman GB 2008. Evaluation of three automated nucleic acid amplification systems for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in first-void urine specimens. *J Clin Microbiol* 46: 2109-2111.

Lin L, Ayala P, Larson J, Mulks M, Fukuda M, Carlsson RS, Enns C, So M 1997. The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol Microbiol* 24: 1083-94.

Loomis WP, Starnbach MN 2002. T cell responses to *Chlamydia trachomatis*. *Curr Opin Microbiol* 5: 87-91.

Lowe P, O'loughlin P, Evans K, White M, Bartley PB, Vohra R 2006. Comparison of the Gen-Probe APTIMA Combo 2 assay to the AMPLICOR CT/NG assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples from Australian men and women. *J Clin Microbiol* 44: 2619-2621.

Macmillan S, McKenzie, Templeton A 2003. Parallel observation of four methods for screening women under 25 years of age for genital infections with *Chlamydia trachomatis*. *Europ J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 107: 68-73.

Mahony J, Chong S, Jang D, Luinstra K, Faught M, Dalby D, Sellors J, Chernesky M 1998. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clin Microbiol* 36: 3122-3126.

Makino S, van Putten JPM, Meyer TF 1991. Phase variation of the opacity outer membrane protein controls invasion by *Neisseria gonorrhoeae* into human epithelial cells. *EMBO J*10: 1307–1315.

Mandrell RE, Apicella MA 1993. Lipo-oligosaccharides (LOS) of mucosal pathogens: molecular mimicry and host-modification of LOS. *Immunobiology*187: 382–402.

Masek BJ, Arora N, Quinn N, Aumakhan B, Holden J, Hardick A, Agreda P, Barnes M, Gaydos CA 2009. Performance of three nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an internet-based screening program. *J Clin Microbiol* 47: 1663-1667.

McGee ZA, Clemens CM, Jensen RL, Klein JJ, Barley LR, Gorby GL 1992. Local induction of tumor necrosis factor as a molecular mechanism of mucosal damage by gonococci. *Microb Pathog*12: 333–341.

McMillan A, McNeillage G, Young H, Bain SR 1979. Serum immunoglobulin response in uncomplicated gonorrhoea. *Br J Vener Dis* 55: 5–9.

Melly MA, McGee ZA, Rosenthal RS 1984. Ability of monomeric peptidoglycan fragments from *Neisseria gonorrhoeae* to damage human fallopian-tube mucosa. *J Infect Dis* 149: 378–386.

Merz AJ, Rifken DB, Arvidson CG, So M 1996. Traversal of a polarized epithelium by pathogenic *Neisseriae*: facilitation by type IV pili and maintenance of epithelial barrier function. *Mol Med* 2: 745–54.

Merz AJ, So M 1997. Attachment of piliated, Opa⁻ and Opc⁻ gonococci and meningococci to epithelial cells elicits cortical actin rearrangements and clustering of tyrosine-phosphorylated proteins. *Infect Immun* 65: 4341-4349.

Merz AJ, So M 2000. Interactions of pathogenic *Neisseriae* with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 423-457.

Michel CEC, Sonnex C, Carne CA, White JA, Magbanua JPV, Nadala ECB, Lee HH 2007. *Chlamydia trachomatis* load at matched anatomic sites: implications for screening strategies. *J Clin Microbiol* 45: 1395-1402.

Ministério da Saúde 1999. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/assistencia/manualcontroledst.pdf>. Data de acesso: 15/07/2010.

Ministério da Saúde 2008. Doenças Infecciosas e parasitárias. Guia de bolso. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_bolso_7_edicao_web.pdf. Data de acesso: 16/06/2010.

Miranda AE, Szwarcwald CL, Peres RL, Shafer-Page K 2004. Prevalence and risk behaviors for Chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. *Sex Trans Dis* 31: 542-546.

Miyairi I, Byrne GI 2006. *Chlamydia* and programmed cell death. *Curr Opin Microbiol* 9: 102-108.

Moncada J, Chow JM, Schachter J 2003. Volume effect on sensitivity of nucleic acid amplification tests for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine specimens from females. *J Clin Microbiol* 41: 4842-4843.

Morrison SG, Su H, Caldwell HD, Morrison RP 2000. Immunity to murine *Chlamydia trachomatis* genital tract reinfection involves B cells and CD4⁺ T cells but not CD8⁺ T cells. *Infect Immun* 68: 6979-6987.

Mosleh IM, Huber LA, Steinlein P, Pasquali C, Gunther D, Meyer TF 1998. *Neisseria gonorrhoeae* porin modulates phagosome maturation. *J Biol Chem* 273: 35332-35338.

Mpiga P, Ravaoarino M 2006. *Chlamydia trachomatis* persistence: an update. *Microbiol Res* 161: 9-19.

Müller A, Gunther D, Dux F, Naumann M, Meyer TF, Rudel T 1999. Neisserial porin (PorB) causes rapid calcium influx in target cells and induces apoptosis by the activation of cysteine proteases. *EMBO* 18: 339-352.

Nassif X, Pujol C, Morand P, Eugene E 1999. Interactions of pathogenic *Neisseriae* with host cell. Is it possible to assemble the puzzle?. *Molec Microbiol* 32: 1124-1132.

Naumann MN, Rudel T, Meyer TF 1999. Host cell interactions and signalling with *Neisseria gonorrhoeae*. *Cur Opin Microbiol* 2: 62-70.

Newhall WJ, Johnson RE, DeLisle S, Fine D, Hadgu A, Matsuda B, Osmond D, Campbell J, Stamm WE 1999. Head-to-Head evaluation of five *Chlamydia* tests relative to a quality-assured culture standard. *J Clin Microbiol* 37: 681-685.

Olshen E, Shrier LA 2005. Diagnostic tests for chlamydial and gonorrheal infections. *Semin Pediatr Infec Dis* 16: 192-198.

Organização Mundial de Saúde (OMS) 2001. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections, Department of Communicable Disease Surveillance and Response. Meeting on prospects for the public health approach to the prevention and care of sexually transmitted infections of sexually transmitted infections in countries of Eastern Europe and Central Asia. Geneva, SW.

Organização Mundial de Saúde (OMS) 2003. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. Department of Reproductive Health and Research. Geneva, SW.

Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, Herring AJ 2003. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 41: 835-837.

Pantelic M, Kim YJ, Bolland S, Chen I, Shively J, Chen T 2005. *Neisseria gonorrhoeae* Kills Carcinoembryonic Antigen-Related Cellular Adhesion Molecule 1 (CD66a)-Expressing Human B Cells and Inhibits Antibody Production. *Infect Immun* 73: 4171-4179.

Parsons NJ, Curry A, Fox AJ, Jones DM, Cole JA, Smith H 1992. The serum resistance of gonococci in the majority of urethral exudates due to sialylated lipopolysaccharide seen as a surface coat. *FEMS Microbiol Lett* 69: 295–299.

Peeling RW, Mabey D, Herring A, Hook EW 2006. Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? *Nat Rev Microbiol* 4: 909-921.

Perfettini JL, Darville T, Gachelin G, Souque P, Huerre M, Dautry-Varsat A, Ojcius DM 2000. Effect of *Chlamydia trachomatis* infection and subsequent tumor necrosis factor alpha secretion on apoptosis in the murine genital tract. *Infect Immun* 68: 2237–2244.

Pirbhai M, Dong F, Zhong Y, Pan KZ, Zhong G 2006. The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *J Biol Chem* 281: 31495– 31501.

Plummer FA, Chubb H, Simonsen JN, Bosire M, Slaney L, Maclean I, Ndinya-Achola JO, Waiyaki P, Brunham RC 1993. Antibody to Rmp (Outer Membrane Protein 3) increases susceptibility to gonococcal infection. *J Clin Invest* 91: 339-343.

PN-DST/AIDS 2003. DST em números. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISD1F318A3PTBRIE.htm>. Data de acesso: 12/04/2008.

Preston A, Mandrell RE, Gibson BW, Apicella MA 1996. The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 22: 139–180.

Puolakkainen M, Hiltunen-Back E, Reunala T, Suhonen S, Lahteenmaki P, Lehtinen M, Paavonen J 1998. Comparison of performances of two commercially available tests, a PCR assay and a ligase chain reaction test, in detection of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *J Clin Microbiol* 36:1489–1493.

Ramos M, Becker D, Germany C, Ritter A, Perin M, Sander M, Figueiras A, Cestari T 2002. Prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em urina de gestantes adolescentes e mulheres atendidas em ambulatórios de ginecologia em hospital público em Porto Alegre, Brasil. *J Bras das Doen Sex Trans* 14: 4-8.

Ramsey KH, Rank RG 1991. Resolution of chlamydial genital infection with antigen-specific T-lymphocyte lines. *Infect Immun* 59: 925-931.

Ramsey KH, Schneider H, Cross AS, Boslego JW, Hoover DL, Staley TL, Kuschner RA, Deal CD 1995. Inflammatory cytokines produced in response to experimental human gonorrhea. *J Infect Dis* 172: 186–191.

Rank RG, Soderberg LSF, Barron AL 1985. Chronic chlamydial genital infection in congenitally athymic nude mice. *Infect Immun* 48: 847-849.

Reshef E, Lei ZM, Rao CV, Pridham DD, Chegini N, Luborsky JL 1990. The presence of gonadotropin receptors in nonpregnant human uterus, human placenta, fetal membranes, and decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 421–430.

Rice PA, Vayo HE, Tam MR, Blake MS 1986. Immunoglobulin G antibodies directed against protein III block killing of serum-resistant *Neisseria gonorrhoeae* by immune serum. *J Exp Med* 164:1735-1748.

Rice PA, Schachter J 1991. Pathogenesis of pelvic inflammatory disease. What are the questions?. *JAMA* 266: 2587-2593.

Risser WL, Bortot AT, Benjamins LJ, Feldmann JM, Barratt MS, Eissa MA, Risser JMH 2005. The epidemiology of sexually transmitted infections in adolescents. *Semin Pediatr Infect Dis* 16: 160-167.

Roan NR, Starnbach MN 2008. Immune-mediated control of *Chlamydia* infection. *Cell Microbiol* 10: 9-19.

Rose SB, Lawton BA, Bromhead C, Macdonald EJ, Lund KA 2007. Self-obtained vaginal swabs for PCR chlamydia testing: a practical alternative. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol* 47: 415-418.

Rosenstraus M, Wang Z, Chang SY, DeBonville D, Spadoro JP 1998. An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance. *J Clin Microbiol* 36: 191-197.

Ryan C, Kudesia G, McIntyre S, Davies S, Zadik P, Kinghorn GR 2007. BD ProbeTec ET assay for the diagnosis of gonorrhoea in a high-risk population: a protocol for replacing traditional microscopy and culture techniques. *Sex Transm Infect* 83: 170-180.

Sakthivel SK, Singh UP, Singh S, Taub DD, Igietseme JU, Jr Lillard JW 2008. CCL5 regulation of mucosal chlamydial immunity and infection. *BMC Microbiol* 8: 136-144.

Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S 2003. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Braz J Infect Dis* 7: 91-95.

Schachter J, Hook EW, MacCormack WM, Quinn TC, Chernesky M, Chong S, Girdner JI, Dixon PB, DeMeo L, Williams E, Cullen A, Lorincz A 1999. Ability of the Digene Hybrid Capture II test to identify *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. *J Clin Microbiol* 37: 3668-3671.

Schachter J, McCormack WM, Chernesky MA, Martin DH, Pol BVD, Rice PA, Hook EW, Stamm WE, Quinn TC, Chow JM 2003. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol* 41: 3784–3789.

Schachter J, Chernesky MA, Willis DE, Fine PM, Martin DH, Fuller D, Jordan JA, Janda W, Hook EW 2005. Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: results from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections. *Sex Transm Dis* 32: 725-728.

Scidmore MA, Rockey DD, Fischer ER, Heinzen RA, Hackstadt T 1996. Vesicular interactions of the *Chlamydia trachomatis* inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry. *Infect Immun* 64: 5366-5372.

Semeniuk H, Zentner A, Read R, Church D 2002. Evaluation of sequential testing strategies using non-amplified and amplified methods for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical and urine specimens from women. *Diag Microbiol and Infect Dis* 42: 43–51

Shafer MA, Moncada J, Boyer CB, Betsinger K, Flinn SD, Schachter J 2003. Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a nucleic acid amplification test. *J Clin Microbiol* 41: 4395-4399.

Simons MP, Nauseef WM, Apicella MA 2005. Interactions of *Neisseria gonorrhoeae* with adherent polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 73: 1971-1977.

Skidmore S, Horner P, Herring A, Sell J, Paul I, Thomas J, Owen Caul E, Egger M, MacCarthy A, Sanford E, Salisbury C, Macleod J, Sterne JAC, Low N 2006. Vulvovaginal-swab or first-catch urine specimen to detect *Chlamydia trachomatis* in women in a community setting?. *J Clin Microbiol* 44: 4389-4394.

Smith H, Parsons NJ, Cole JA 1995. Sialylation of neisserial lipopolysaccharides: a major influence on pathogenicity. *Microb Pathog* 19: 365-377.

Soares VL, Mesquita AMS, Cavalcante FGR, Silva ZP, Hora V, Diedrich T, Silva PC, Melo PG, Dacal ARC, de Carvalho EMF, Feldmeier H 2003. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Trop Med Int Health* 8: 595-603.

Song W, Condron S, Mocca BT, Veit SJ, Hill D, Abbas A, Jerse AE 2008. Local and humoral immune responses against primary and repeat *Neisseria gonorrhoeae* genital tract infections of 17 β -estradiol-treated mice. *Vaccine* 23: 5741-5751.

Sonnex C 1998. Influence of ovarian hormones on urogenital infection. *Sex Transm Inf* 74: 11-19.

Spaargaren J, Fennema HS, Morre SA, Vries HJ, Coutinho RA 2005. New lymphogranuloma venereum *Chlamydia trachomatis* variant. *Emerg Infect Dis* 11: 1090-1092.

Spence JM, Chen JCR, Clark VL 1997. A proposed role for the lutropin receptor in contact-inducible gonococcal invasion of Hec1B cells. *Infect Immun* 65: 3736-3742.

Stary A, Schuh E, Kerschbaumer M, Gotz B, Lee H 1998. Performance of transcription-mediated amplification and ligase chain reaction assays for detection of chlamydial infection in urogenital samples obtained by invasive and noninvasive methods. *J Clin Microbiol* 36: 2666-2670.

Stephens DS, McGee ZA, Cooper MD 1987. Cytopathic effects of pathogenic *Neisseria*. Studies using human fallopian tube organ cultures and nasopharyngeal organ cultures. *Antonie Leeuwenhoek* 53: 575–584.

Sun G, Pal S, sarcon AK, kim S, Sugawara E, Nikaido H, Cocco MJ, Peterson EM, de la Maza LM 2007. Structural and functional analyses of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J Bacteriol* 189: 6222-6235.

Swanson J 1973. Pili IV their role in attachment of gonococci to tissue culture cells. *J Exper Med* 137: 517-589.

Tramont EC 1977. Inhibition of adherence of *Neisseria gonorrhoeae* by human genital secretions. *J Clin Invest* 59: 117–124.

Tshibaka LM, Alary M, Bernier F, Van Dick E, Lowndes CM, Guédou A, Anagonou S, Joly JR 2000. Diagnostic performance of the Roche AMPLICOR PCR in detecting *Neisseria gonorrhoeae* in genitourinary specimens from female sex workers in Cotonou, Benin. *J Clin Microbiol* 38: 4076-4079.

Tsirpouchtsidis A, Hurwitz R, Brinkmann V, Meyer TF, Hass G 2002. Neisserial immunoglobulin A1 protease induces specific T-cell responses in humans. *Infec Immun* 70: 335-344.

Van der Pol B, Ferrero DV, Bauck-Barrington L, Hook E, Lenderman C, Quinn T, GaydosCA, Lovchik J, Schachter J, Moncada J, Hall G, Tuohy MJ, Jones RB 2001. Multicenter evaluation of the BDProbeTec ET System for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine specimens, female endocervical swabs, and male urethral swabs. *J Clin Microbiol* 39: 1008-1016.

Van Dyck E, Ieven M, Pattyn S, Van Damme L, Laga M 2001. Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by enzyme immunoassay, culture, and three nucleic acid amplification tests. *J Clin Microbiol* 39: 1751-1756.

van Doornum GJ, Schouls LM, Pijl A, Cairo I, Buimer M, Bruisten S 2001. Comparison between the LCx Probe system and the COBAS AMPLICOR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in patients attending a clinic for treatment of sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands. *J Clin Microbiol* 39: 829–835.

van Putten JPM 1993. Phase variation of lipopolysaccharide directs interconversion of invasive and immuno-resistant phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae*. *EMBO J* 12: 4043–4051.

van Putten JPM, Robertson BD 1995. Molecular mechanisms and implications for infection of lipopolysaccharide variation in *Neisseria*. *Molec Microbiol* 16: 847-853.

Vincelette J, Schirm J, Bogard M, Bourgault AM, Luijt DS, Bianchi A, Vader PCV, Butcher A, Rosenstraus M 1999. Multicenter evaluation of the fully automated COBAS AMPLICOR PCR test for detection of *Chlamydia trachomatis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 37: 74-80.

Virji M, Makepeace K, Ferguson DJ, Watt SM 1996. Carcinoembryonic antigens (CD66) on epithelial cells and neutrophils are receptors for Opa proteins of pathogenic *Neisseriae*. *Mol Microbiol* 22: 941–950.

Wall D, Kaiser D 1999. Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 32: 1–10.

Westrom L, Wolner-Hanssen P 1993. Pathogenesis of pelvic inflammatory disease. *Genitourin Med* 69: 9-17.

Whiley DM, Tapsall JW, Sloots TP 2006. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Molec Diag* 8: 1-15.

Williams JM, Chen GC, Zhu L, Rest RF 1998. Using the yeast two-hybrid system to identify human epithelial cell proteins that bind gonococcal Opa proteins: intracellular gonococci bind pyruvate kinase via their Opa proteins and require host pyruvate for growth. *Mol Microbiol* 27: 171–186.

Witkin SS 2002. Immunological aspects of genital chlamydia infections. *Best Prac & Res Clin Obst Gyn* 16: 865-874.

Zhang JP, Stephens RS 1992. Mechanism of *Chlamydia trachomatis* attachment to eukaryotic host cells. *Cell* 69: 861–869.

Zhong G, Fan T, Liu L 1999. *Chlamydia* inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *J Exp Med* 189: 1931–1938.

Zhong G, Liu L, Fan T, Fan P, Ji H 2000. Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in *Chlamydia*-infected cells. *J Exp Med* 191: 1525–1534.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL

PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG N° 086/05

Goiânia,

24/11/2005

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Profª Maria de Fátima Coista Alves

TÍTULO: “Estudo da prevalência de doenças sexualmente transmissíveis (DST) em adolescentes e jovens do sexo feminino do Estado de Goiás”

Área Temática: Grupo III

Local de Realização: IPTSP/UFG

Senhor(a) Pesquisador (a),

Informamos que o Comitê de Ética e Pesquisa Médica Humana e Animal, após análise das respostas adequada às solicitações, este CEPBHA/HC/UFG, aprova sem restrições o projeto de Pesquisa acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos regentes.

→ Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

→ O pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

Prof. Joffre Rezende Filho
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

ANEXO B – Consentimento Informado nº1

PROJETO ADOLESCER COM SAÚDE

CONSENTIMENTO INFORMADO Nº 1

A Universidade Federal de Goiás, através do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública está realizando uma pesquisa, apoiada pelo Ministério da Saúde e a Secretaria Municipal de Saúde, com o objetivo de estudar alguns problemas de saúde das adolescentes. Se você concordar em participar dessa pesquisa, deverá responder a um questionário que é confidencial, não havendo nenhuma identificação pessoal que estará ligada às suas respostas. E você poderá recusar-se a responder qualquer uma das perguntas feitas. Não haverá nenhum risco para você, uma vez que apenas responderá um questionário. E como benefício terá as orientações sobre possíveis problemas de saúde que possa relatar. Se não desejar participar da pesquisa, será atendida normalmente, de acordo com a rotina do serviço.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Aceito participar da pesquisa acima referida, após ter lido este consentimento e tido oportunidade de fazer perguntas e de refletir sobre as informações que me foram dadas. Minha participação é inteiramente voluntária.

Assinatura da participante: _____

Responsáveis pela pesquisa:

Maria de Fátima Costa Alves
Professora Associada IPTSP-UFG
Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia
aplicadas às Doenças Infecciosas
Fone: (62)3209-6119

Eleuse Machado de Britto Guimarães
Professora Titular-UFG/ Médica de adolescentes
Fone: (62) 3209-6119

Coordenadora local

Fone _____

Local: _____, _____ de _____ de 200 _____

COLAR ETIQUETA AQUI

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____

ANEXO C – Consentimento Informado n°2

PROJETO ADOLESCER COM SAÚDE CONSENTIMENTO INFORMADO Nº 2

Prezada jovem,

Existem alguns micróbios que podem dar infecção na vagina e útero e, muitas vezes, não dão sintomas. Mas apesar disso, se não forem tratados poderão dar complicações como, por exemplo, infecção das trompas, levando à incapacidade de engravidar. Daí a importância do seu diagnóstico. Por esta razão, a Universidade Federal de Goiás através do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública está realizando esta pesquisa (apoiada pelo Ministério da Saúde e Secretaria Municipal de Saúde), para poder diagnosticar estas infecções e tratar as pacientes que estiverem infectadas e assim, evitar que elas apresentem as possíveis complicações.

Como se trata de uma pesquisa, necessitamos que você dê seu consentimento para responder a um questionário confidencial e também para a coleta do material para os exames laboratoriais.

Queremos lhe esclarecer que você realizará exames simples: 1) primeiro, fará um exame de urina que será colhida por você mesma, depois de orientada como fazer. 2) também fará coleta de secreção vaginal e sangue. Durante o procedimento pode ocorrer um pequeno sangramento no seu braço, que aparecerá sob a forma de uma mancha roxa. Quanto aos benefícios, você terá um diagnóstico de certeza, quanto às possíveis infecções, o que provavelmente não aconteceria se você não realizasse esses exames e será tratada quando necessário.

Esclarecemos ainda que você terá o direito de saber os resultados dos exames realizados e de obter resposta a qualquer dúvida sobre esse estudo. Informamos que seu nome será mantido em segredo e que somente participará da pesquisa se você quiser. Se não desejar participar da pesquisa, será atendida normalmente de acordo com a rotina do serviço. E se quiser interromper sua participação no estudo poderá fazê-lo no momento que desejar.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Aceito participar da pesquisa acima referida, após ter lido este consentimento e tido oportunidade de fazer perguntas e de refletir sobre as informações que me foram dadas.

Assinatura da participante: _____

Responsáveis pela pesquisa:

Maria de Fátima Costa Alves
Professora Associada IPTSP-UFG
Laboratório de Biologia Molecular e Imunologia aplicadas às
Doenças Infecciosas
Fone: (62)3209-6119

Eleuse Machado de Britto Guimarães
Professora Titular-UFG/ Médica de adolescentes
Fone: (62) 3209-6119

COLAR ETIQUETA AQUI

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: _____

ANEXO D – Questionário n°1

PROJETO ADOLESCER COM SAÚDE

Questionário 1

CONFIDENCIAL

Unidade básica: _____
Data da entrevista: ___/___/___

NÚMERO DE IDENTIFICAÇÃO:

Projeto Adolescer com Saúde

Data: ___/___/2007.

PARTE 1

1- Qual a sua idade? _____ anos completos.

IDADE

2- Estado civil:

1.() solteira
2.() casada
3.() vive junto
4.() divorciada/desquitada

ESTCIV

3- Tem religião?

1.() Sim
2.() Não

TRELIG

4- Qual é a sua religião?

1.() católica
2.() evangélica . Qual? _____
3.() espírita
4.() outra igreja

QRELIG

5- É praticante? (mínimo 1 X por mês)

1.() Sim
2.() Não

PRATI

6- Você estuda ou estudou até:

1.() 1ª a 4ª série do 1º grau
2.() 5ª a 8ª série do 1º grau
3.() 2º grau incompleto
4.() 2º grau completo
5.() curso superior incompleto
6.() não estudou

ESTUD

7- Sua mãe estudou até:

1.() 1ª a 4ª série do 1º grau
2.() 5ª a 8ª série do 1º grau
3.() 2º grau incompleto
4.() 2º grau completo
5.() curso superior incompleto
6.() curso superior completo
7.() não estudou
8.() não sei

ESTMAE

8- Qual a renda total da sua família?

1.() menor que 2 salários-mínimos
2.() de 2 a 4 salários-mínimos
3.() de 5 a 10 salários-mínimos
4.() maior de 10 salários-mínimos
5.() Não sei

RENDA

9- Quantas pessoas moram na sua casa?

MORA

10- Você tem algum problema ou preocupação com a sua saúde?

1.() Não
2.() Sim. Qual? _____

SAUDE

11- Você tem algum problema com sua menstruação?

1.() Irregularidade menstrual
2.() Cólica menstrual
3.() Outras. Qual? _____
4.() Não tem problema

MENST

12- Você vai bem na escola?

1.() Sim
2.() Não. Por quê? _____

BEMES

13- Você está satisfeita com seu relacionamento com seus pais?

1.() Sim
2.() Não. Por quê? _____

RELPAI

14- Você já tomou vacina contra hepatite B?

1.() Sim. Quantas doses? () 1 () 2 () 3
2.() Não

VACINA

15- Você já transou (relação sexual)?

1.() Sim
2.() Não

RELSEX

PARTE 2

16- Com que idade você teve sua primeira relação sexual? _____ anos

17- Sua primeira relação sexual foi com:

1. () namorado
 2. () esposo ou pessoa com a qual você vive junto
 3. () amigo
 4. () prostituto
 5. () estranho/ recém-conhecido, outra pessoa.
 6. () Abuso sexual

18- Quantos parceiros sexuais você teve durante sua vida? _____ parceiros

19- Quantos parceiros sexuais você teve nos últimos três meses?

1. () 1
 2. () 2
 3. () 3
 4. () 4 ou mais
 5. () Nenhum

20- Você teve um novo parceiro nos últimos três meses?

1. () Sim
 2. () Não

SEXAR
 PRISEX
 NUPAR
 NUPAR3
 NOVPAR

21- Nos últimos três meses, você transou com algum parceiro que tinha secreção no pênis, dor ao urinar ou outro tipo de Doença Sexualmente Transmissível (DST)?

1. () Sim
 2. () Não
 3. () Não sei

22- Você tem parceiro fixo?

1. () Sim
 2. () Não

23- Se a resposta anterior for "sim"- Você costuma transar com outros rapazes mesmo tendo parceiro fixo?

1. () Sim
 2. () Não

24- Nas vezes em que transou, os seus parceiros usaram camisinha?

1. () Sempre (todas as vezes)
 2. () Às vezes (mais da metade das vezes)
 3. () Raramente (menos da metade das vezes)
 4. () Nunca

DSTPAR
 PARFIX
 TRAI
 CAMIS

25- Caso seu parceiro ou seus parceiros não usem camisinha em todas as relações sexuais, cite até três motivos que o(s) levou(ram) a não usar a camisinha.

1. () Nenhum
 2. () Custa muito caro
 3. () Não sabe ou não tem onde comprar
 4. () Tem vergonha de comprar
 5. () Não sabe usar
 6. () Diminui o prazer
 7. () Quebra o clima da transa
 8. () É difícil e embaraçoso de usar
 9. () O parceiro não gosta
 10. () Tem vergonha de pedir para o parceiro usar
 11. () Porque acha que não precisa
 12. () Tem medo de ser mal compreendido
 13. () Porque sua religião proíbe
 14. () Porque confia no parceiro

26- Que tipos de relação sexual você já teve?

Pênis-vagina
 1. () Sim 2. () Não

Sexo oral (boca nos genitais)
 1. () Sim 2. () Não

Sexo anal (pênis no ânus)
 1. () Sim 2. () Não

NCAMIS
 VAGINA
 ORAL
 ANAL

27- Você já teve experiência sexual:

a) Sexo em troca de dinheiro
 1. () Sim 2. () Não

b) Sexo em troca de drogas
 1. () Sim 2. () Não

c) Sexo com prostituto
 1. () Sim 2. () Não

d) Com pessoa que usa droga injetável
 1. () Sim 2. () Não

28- Você acha que seu parceiro tem outras parceiras ao mesmo tempo que está com você?

1. () Sim
 2. () Não
 3. () Não sei

29- Você já engravidou alguma vez?

1. () Sim. Quantas vezes? _____ vezes
 2. () Não

30- Qual sua idade na 1ª gravidez? _____ anos

31- Seu parceiro usou preservativo (camisinha) na última relação sexual?

1. () Sim
 2. () Não

DINHER
 DROGA
 PROST
 DROINJ
 PARTRAI
 GRAVID
 IDGRAV
 ULCAMI

32- Algum profissional de saúde já diagnosticou em você alguma doença sexualmente transmissível?

- 1. () Sim
- 2. () Não
- 3. () Não sei

DST

33- Qual DST? _____

34- Você utilizou algum antibiótico (oral ou tópico) nos últimos 15 dias?

- 1. () Sim
- 2. () Não
- 3. () Não sei

ANTIB



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid

Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil



Yanna Andressa Ramos de Lima^{a,*}, Marília Dalva Turchi^a, Zulmirene Cardoso Fonseca^a,
Fernanda Lopes Brito Garcia^a, Fernanda Alves de Brito e Cardoso^a,
Mônica Nogueira da Guarda Reis^a, Eleuse Machado de Britto Guimarães^b,
Rosane Ribeiro Figueiredo Alves^b, Nígela Rodrigues Carvalho^a,
Maria de Fátima Costa Alves^a

^a Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Rua 235, s/n, Setor Universitário, CEP 74605050, Goiânia, Goiás, Brazil

^b Faculty of Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2013

Received in revised form 23 March 2014

Accepted 27 March 2014

Corresponding Editor: Eskild Petersen,
Aarhus, Denmark

Keywords:

Bacterial sexually transmitted infections

Prevalence

Risk factor

Epidemiology

Young women

SUMMARY

Background: Studies on sexually transmitted infections in Brazil are done mainly in large metropolises and screening is available for pregnant women only. We aimed to estimate the prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Treponema pallidum* infection among young non-pregnant women in non-clinical settings in middle-sized cities of Central Brazil.

Methods: A cross-sectional community-based sample of 1072 participants was included. Sexually active women (64.9%) provided first-catch urine samples for PCR investigation of chlamydial and gonococcal infection. Syphilis was tested in serum. Univariate analysis investigated risk factors for chlamydial infection. Multivariate logistic regression included associations with a *p*-value <0.20.

Results: The mean age of participants was 18 years; 73.2% reported unprotected intercourse, 37.6% were married/cohabiting, and 5% reported a previous STI. Prevalence rates of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, and *T. pallidum* were 9.6% (95% confidence interval (CI) 7.4–12.4%), 0.7% (95% CI 0.2–1.9%), and 0.15% (95% CI 0.0–0.7%), respectively. After adjustments, being <20 years old (adjusted odds ratio (aOR) 1.90, 95% CI 1.07–3.37) and having three or more lifetime sexual partners (aOR 2.57, 95% CI 1.46–4.53) were associated with the risk for chlamydial infection.

Conclusions: We observed a high prevalence of chlamydial infection and sexual risk behaviors in this population. These findings are important to guide screening strategies in Brazil.

© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

1. Introduction

Chlamydia trachomatis, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Treponema pallidum* are the most common pathogens responsible for bacterial sexually transmitted infections (STI) worldwide, disproportionately affecting women under 25 years of age.¹ According to the World Health Organization (WHO), approximately 126 million new cases of curable STIs occur each year in the region of the Americas.¹

C. trachomatis is an obligate intracellular pathogen that infects epithelial cells of the genital tract. The infection resolve

spontaneously in most infected women, but persistent infection may occur and lead to the spread of the pathogen to the upper genital tract. *N. gonorrhoeae* is the etiological agent of gonorrhea, an infection on the surface of the urethra, endocervix, and fallopian tubes. Clinically it is indistinguishable from genital chlamydial infection. Asymptomatic infection is frequent among women, increasing the risk of persistent undiagnosed chlamydial and gonococcal infections, which may lead to complications such as pelvic inflammatory disease (PID), infertility, ectopic pregnancy, and chronic abdominal pain.² *T. pallidum* is the causative organism of syphilis, a chronic infection that may persist for years, leading to cardiovascular and neurological damage. Syphilis is especially related to adverse outcomes in pregnancy, such as late abortion, prematurity, low birth weight, neonatal death, and congenital infection.³ Bacterial STI complications are an important prevent-

* Corresponding author. Tel.: +55 62 32096111; Fax: +55 62 35211839.
E-mail address: yanna.and@gmail.com (Y.A.R. de Lima).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.1389>

1201-9712/© 2014 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

able cause of reproductive sequelae, infertility, and adverse pregnancy outcomes in women.⁴

Screening strategies are useful to identify and treat asymptomatic infected people, preventing complications and avoiding dissemination among sexual contacts.⁵ *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* screening has been carried out in countries such as the USA, the UK, and Sweden.^{6–9} Chlamydial and gonococcal infections should be investigated in sexually active individuals under the age of 25 years, especially women.⁶ Syphilis testing should be performed in all pregnant women and individuals at elevated risk.¹⁰ In Brazil, STI screening is routine only for pregnant women and includes only hepatitis B, HIV, and syphilis testing.¹¹

According to previous studies, the prevalence rate of *C. trachomatis* infection in Brazil ranges from 7.3% to 17.6% among young non-pregnant women in non-clinical settings.^{12–15} These studies were performed in large cities and there is currently a lack of data from outside metropolises. Brazil is a country of continental proportions. Thus, middle-sized cities may represent an important missing setting for the evaluation of STI prevalence and for the collection of important information for the implementation of screening strategies. The present study aimed to estimate the prevalence of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, and *T. pallidum* infections and to investigate behavior and social variables potentially associated with STIs in asymptomatic non-pregnant young women in middle-sized cities of Central Western Brazil.

2. Methods

2.1. Study design, setting, and sampling

This study was a community-based, cross-sectional survey performed in three cities (Ceres, Catalão, and Inhumas) in the state of Goiás, Central Western Brazil, between 2007 and 2009. The overall population of these cities was 141 046 inhabitants, with an estimated 4500 women under 25 years of age monitored by a public health program known as the Family Health Program (FHP). The FHP is an assistance public health service covering all Brazilian cities and is responsible for promoting primary health care by implementing interventions according to community risk factors. The FHP consists of health units with multidisciplinary teams responsible for monitoring a defined number of families.¹⁶

Ceres is a city in the north of Goiás State, with 18 637 inhabitants and six family health units. Catalão is located in the southeast, with 75 623 inhabitants and three family health units. Inhumas is situated in the central region of the state, at a distance of 54 km from the capital Goiânia, and has a population of 46 786 inhabitants with 13 family health units. These cities were randomly selected to represent the urban population outside the capital in Central Western Brazil.

All women aged 15–24 years monitored by the FHP in the selected cities were potentially eligible. Census information was provided by the local health department. The sample size was calculated using Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health software (OpenEpi version 2.3.1). The sample size was based on the study design (prevalence study without clustering, i.e., effect design = 1). The number of participants required was 646 sexually active non-pregnant women aged 15–24 years, based on a minimum expected STI prevalence of 2.0%, with a 1.0% precision and a confidence interval of 95%. Syphilis was expected to be the STI with the lowest prevalence. Taking into consideration that 20% of young women would not be living at the recorded address (could not be contacted), that approximately 40% of the invited young women would not be sexually experienced (would not be eligible), that 10% of the sexually experienced would be pregnant or would have used antimicrobials in the previous 15 days (would

not be eligible), and anticipating a refusal rate of 25%, the final estimated sample size was 1250 women.

The recruitment process was done in two phases. The sampling process was done in the first phase of recruitment. The local health departments provided a list of households with potential participants (women aged 15–24 years registered at a family health unit). A number was assigned to each potential participant, and a simple sampling was done using a computer-generated list of random numbers (Epi Info software 3.4. version). From a finite population of approximately 4500 young women, 1250 were invited by letter to present to the nearest family health unit. In the second phase, all women who accepted the invitation and met the inclusion criteria were included in the study.

Volunteers who presented to the local family health unit were first informed about the study and then interviewed by a trained nurse or physician using a structured questionnaire to collect information on socio-demographic variables, including level of education, mother's schooling, and family income, which was measured in minimum Brazilian wages (US\$ 213 at the time of the study). Participants were questioned on their previous sexual experience and issues related to general health knowledge and health concerns. Women who reported previous sexual activity were then invited for further procedures, including a second interview using a more specific questionnaire containing questions about sexual practices and reproductive life, such as the onset of sexual life, number of partners, condom use, and STI history. Women who referred to antimicrobial use within the previous 15 days or who were pregnant were excluded. All eligible young women were requested to sign a written informed consent form and were referred for first-catch urine and blood sample collection for the diagnosis of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, and *T. pallidum*.

2.2. Laboratory procedures

For *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* diagnostics, participants were instructed to collect an approximately 20-ml first-catch urine specimen after at least 2 h without urinating. PCR for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* was performed using the AmpliCor CT/NG Kit (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA) in accordance with the manufacturer's instructions, at the Infectious Diseases Immunology and Molecular Biology Laboratory of the Institute of Tropical Pathology and Public Health of the Federal University of Goiás, Brazil. In brief, a ~208-bp nucleotide sequence of *C. trachomatis* and a ~201-bp nucleotide sequence of *N. gonorrhoeae* DNA were amplified with biotinylated primers. A hybridization chain reaction was then performed to identify target sequences. Internal controls were used in all amplification assays.

For syphilis diagnostics, a 10-ml sample of venous blood was collected from an arm vein, and 5 ml of serum was obtained and stored at –70 °C until analysis. All basic biosafety standards were assured during blood collection. The non-treponemal VDRL (Venereal Disease Research Laboratory) test was performed on all serum samples. Confirmation of positive results was done with an FTA-Abs test (fluorescent treponemal antibody absorption test).

2.3. Data analysis

A descriptive analysis was performed for the socio-demographic and sexual behavior variables. Continuous variables were described as the median with interquartile range (IQR). Categorical variables were presented as the frequency and percentage. The Chi-square test or Fisher's exact test was used to analyze the differences among categorical variables, with a significance level of 5%. The prevalence of *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, and *T. pallidum* infections and their respective 95% confidence intervals (95% CI)

were estimated as the number of positive tests divided by the total number of women tested.

Univariate analysis was performed to investigate possible associations between *C. trachomatis*-positive tests and socio-demographic and behavior variables. All associations with a *p*-value <0.20 were then included in a multivariate logistic regression analysis. In the final analysis, a *p*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. Risk factors for gonococcal infection and syphilis were not assessed due to a low expected prevalence rate requiring a larger sample size. Data analyses were conducted using Epi Info version 3.5.1 and SPSS version 13.0.

3. Results

A total of 1072 asymptomatic young women (15–24 years) were recruited; 696 (64.9%) of them declared being sexually experienced and not pregnant, and were therefore eligible for the study. No significant differences regarding socio-demographic and behavioral characteristics were observed among volunteers from each city. The median age of the 696 sexually active participants was 20 years (IQR 17–22 years) and 37.8% of them were already married or cohabiting. Most of the eligible participants had completed more than 8 years of schooling (72.8%), had poorly educated mothers (70%), and a low family income (<4 minimum wages/month, 85.1%).

Concerning sexual behavior, more than 20% of participants were younger than 15 years at first intercourse (median age at first intercourse 16 years, IQR 15–17 years). Half of them reported two or more lifetime sexual partners. Nevertheless, more than 80% reported only one sexual partner in the last 3 months. Approximately 70% of subjects reported inconsistent use of condoms and 5% reported a previous STI diagnostic. Regular use of condoms was more frequently reported by single women than by married or cohabiting women ($p < 0.001$). Almost 40% of participants had been pregnant at least once and more than 25% of them were younger than 15 years at first pregnancy.

Table 1

Prevalence of bacterial sexually transmitted infections in asymptomatic sexually active young women in Central Western Brazil

	Positives	Tested	Prevalence % (95% CI)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	55	574	9.6 (7.4–12.4)
Ceres	13	106	10.9 (5.9–18.0)
Catalão	12	99	12.1 (6.4–20.2)
Inhumas	30	356	8.4 (5.8–11.9)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	4	574	0.7 (0.2–1.9)
<i>Treponema pallidum</i>	1	685	0.1 (0.0–0.9)

CI, confidence interval.

Five hundred seventy-four (82.5%) subjects provided a first-catch urine sample for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* testing. Those who did not provide a urine sample were in menses or were taking antimicrobial therapy at that time or had taken such therapy in the prior 15 days, and failed to attend for a second visit. No specific information was gathered about non-compliers. Six hundred and eighty-five (98.4%) blood samples were available for syphilis diagnosis. Eleven blood samples (1.6%) were excluded due to hemolysis.

3.1. Prevalence of bacterial STIs

The overall prevalence of *C. trachomatis* infection was 9.6% (95% CI 7.4–12.4%), while the prevalences of *N. gonorrhoeae* and *T. pallidum* infection were 0.7% (95% CI 0.2–1.9%) and 0.15% (95% CI 0.0–0.7%), respectively. None of the participants with a positive test presented a co-infection. There was no significant difference in prevalence of *C. trachomatis* infection among participants from the three cities (Table 1).

3.2. Socio-demographic and sexual behavior variables associated with the risk for STI

Univariate analysis demonstrated that *C. trachomatis* positivity was associated with younger age (15–19 years old), early onset of sexual life (<15 years), and having three or more lifetime sexual

Table 2

Univariate analysis of socio-demographic variables potentially associated with the risk for *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active young women in Central Western Brazil

Variables	Number of patients (%) (n = 696)	<i>C. trachomatis</i> -positive (n = 574)	OR (95% CI)	<i>p</i> -Value
Origin				
Ceres	145 (62.2)	13	1.01 (0.41–2.53)	0.855
Catalão	123 (65.4)	12	1.50 (0.69–3.20)	0.353
Inhumas	428 (65.7)	30	1.52 (0.72–3.17)	0.315
Age, years				
15–19	346 (49.7)	35	1.90 (1.07–3.37)	0.039 ^a
20–24	350 (50.3)	20		
Marital status				
Single	431 (61.9)	37	1.45 (0.78–2.73)	0.213
Married/cohabiting	262 (37.6)	18		
NA	3 (0.4)			
Schooling, years				
≤ 8	189 (27.2)	15	1.05 (0.53–2.03)	0.883
>8	506 (72.7)	40		
NA	1 (0.1)			
Mother's schooling, years				
≤ 8	486 (70.0)	35	0.61 (0.33–1.12)	0.147
>8	160 (23.1)	18		
NA	48 (6.9)			
Family income, minimum wage ^b				
≤ 4	592 (85.1)	45	0.69 (0.31–1.54)	0.496
>4	79 (11.4)	8		
NA	25 (3.6)			

OR, odds ratio; CI, confidence interval; NA, not available.

^a Statistically significant, *p*-value < 0.05; Fisher's exact test was used for frequencies <5.

^b Minimum Brazilian wage at the time of study: R\$ 380.00 (approximately US\$ 213.00).

Table 3
Univariate analysis of behavioral variables potentially associated with *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active young women in Central Western Brazil

Variables	Number of patients (%) (n = 696)	<i>C. trachomatis</i> -positive (n = 574)	OR (95% CI)	p-Value
Age at first intercourse, years				
<15	165 (23.7)	20	2.14 (1.18–3.86)	0.013 ^a
≥15	527 (75.7)	34		
NA	4 (0.6)			
Number of lifetime sexual partners				
≥3	213 (31.1)	27	2.57 (1.46–4.53)	0.001 ^a
<3	471 (68.9)	27		
NA	12 (1.7)			
Number of sexual partners in the last 3 months				
≥3	9 (1.3)	1	1.61 (0.19–13.60)	0.503
<3	683 (98.1)	53		
NA	4 (0.6)			
Regular partner				
No	101 (14.5)	9	1.31 (0.61–2.80)	0.622
Yes	585 (84.1)	45		
NA	10 (1.4)			
Condom use				
Never	98 (14.1)	8	1.05 (0.38–2.88)	0.915
Sometimes/rarely	408 (58.6)	33		
Always	185 (26.6)	13		
NA	5 (0.7)			
Previous pregnancy				
Yes	271 (38.9)	18	0.76 (0.42–1.38)	0.449
No	416 (59.8)	35		
NA	9 (1.3)			
Age at first pregnancy, years				
<15	33 (12.2)	5	2.90 (0.95–8.85)	0.115
≥15	234 (86.3)	13		
NA	4 (1.5)			
STI history				
Yes	33 (4.7)	2	0.73 (0.17–3.18)	1.000
No	638 (91.7)	50		
NA	25 (3.6)			
Sexual intercourse with a symptomatic partner				
Yes	36 (5.2)	3	1.15 (0.34–3.95)	0.742
No	623 (89.5)	47		
NA	37 (5.3)			

OR, odds ratio; CI, confidence interval; NA, not available; STI, sexually transmitted infection.

^a Statistically significant, *p*-value < 0.05; Fisher's exact test was used for frequencies <5.

partners. Participants who reported a previous pregnancy or inconsistent condom use did not present a higher risk for chlamydial infection. Socio-demographic and behavior variables potentially associated with the risk for *C. trachomatis* positivity are shown in Tables 2 and 3.

To further explore these associations, a multivariate analysis was performed. The following exposure variables were included in the logistic regression model: age (<20 vs. ≥20 years), age at first intercourse (<15 vs. ≥15 years), and number of lifetime sexual partners (<3 vs. ≥3). Age ranging from 15 and 19 years (odds ratio (OR) 2.16, 95% CI 1.18–3.97) and having three or more sexual partners in life (OR 2.56, 95% CI 1.38–4.74) remained indepen-

dently associated with the risk for *C. trachomatis* infection even after adjustments for possible confounding factors (Table 4).

Risk factors for *N. gonorrhoeae* and *T. pallidum* infection were not assessed due to the low prevalence observed. There were four positive cases of *N. gonorrhoeae* infection and one positive case of syphilis. The women with gonococcal infection were between 18 and 22 years old; two of the four reported less than 8 years of schooling, two were single, and three were aged 15 years at first intercourse. These participants reported one to six lifetime sexual partners and only one sexual partner in the last 3 months. Two of them reported a previous pregnancy and only one reported regular use of condoms. The only case positive for syphilis was a 24-year-

Table 4
Multivariate analysis of socio-demographic and sexual behavior associated risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in young women in Central Western Brazil

Variable	<i>C. trachomatis</i> -positive (n = 574)	OR (95% CI)	p-Value	aOR (95% CI)	p-Value
Age, years					
15–19	35	1.90 (1.07–3.37)	0.039 ^a	2.16 (1.18–3.97)	0.0128 ^a
20–24	20				
Age at first intercourse, years ^b					
<15	20	2.14 (1.18–3.86)	0.013 ^a	1.40 (0.73–2.66)	0.3069
≥15	34				
Number of lifetime sexual partners ^b					
≥3	27	2.57 (1.45–4.53)	<0.001 ^a	2.56 (1.38–4.74)	0.0028 ^a
<3	27				

OR, odds ratio; CI, confidence interval; aOR, adjusted odds ratio.

^a Statistically significant, *p*-value < 0.05; Fisher's exact test was used for frequencies <5.^b Some variables were not available for all participants.

old married woman with less than 8 years of schooling who reported an onset of sexual life at 15 years of age and who had only had one sexual partner in life. She referred to never having used a condom in her life and a previous pregnancy at the age of 18 years.

4. Discussion

The prevalence rate observed for chlamydial infection is in accordance with those found in studies involving sexually active young Brazilian women in the northeast region (6–17.1%) and southeast region of the country (7.4–12.2%).^{17–20} A similar prevalence rate (9.8%) was also observed in a national population-based study conducted in parturient women aged 15–24 years.²¹ However, previous studies performed in young women recruited in the capital Goiânia, Goiás (Central Western Region) presented higher prevalence rates (14.5–17.6%).^{12,13} Our findings are also in accordance with estimated prevalence rates found in other studies performed in asymptomatic young women outside STI clinics in other countries: USA (8%), Norway (7.2%), and Canada (9.3%).^{22–24}

Regarding *N. gonorrhoeae* infection, previous studies in asymptomatic Brazilian women recruited in non-clinic settings demonstrated similar prevalence rates to that found in the present study, ranging from 0.8% to 2.1%.^{13,17,18,21} Otherwise, a higher prevalence rate of gonococcal infection (3.2%) was observed in a population recruited in 2000 at family health units in three Brazilian slums of Salvador, Bahia.¹⁸ A higher rate of gonococcal prevalence (4.0%) was observed in women at public health services recruited in 2011 in large cities of the southeast of Brazil.²⁵ The lower prevalence rate found in our study could be explained by the type of specimen used for diagnosis. Although nucleic acid amplification tests are highly appropriate for the detection of genital gonococcal infection,²⁶ a low sensitivity of PCR has been demonstrated for *N. gonorrhoeae* detection in urine samples.²⁷

The syphilis prevalence rate observed in this population was consistent with data from a large urbanized area of Brazil.²⁸ Meanwhile, a significantly higher rate of syphilis was identified in female public health attendees in the northeast region of Brazil (5.1%, 95% CI 2.4–9.6%).¹⁸ Regardless of the low prevalence observed for *T. pallidum* infection in this study, this is a cause for concern, since this is a population of child-bearing age. Teenage pregnancy represents a higher vulnerability for STIs and their associated complications, including an increased susceptibility to HIV-1 acquisition.²⁹ In this young population, a previous pregnancy was reported frequently and a high percentage had become pregnant at less than 15 years of age, reflecting a public health issue.

C. trachomatis positivity was significantly associated with being aged less than 20 years and having three or more lifetime sexual partners, corroborating the results of a prior study in a similar population.²¹ Inconsistent condom use was not associated with positivity for chlamydial infection. This lack of association may be related to the definition of 'inconsistent use', in which one may answer 'always' for the use of condoms in most sexual encounters or just for the use of condoms with the current partner. As a great proportion of participants reported having a steady partner, the lack of association may also be related to the fact that those women in a regular relationship were more likely to use condoms inconsistently.

The study presents some limitations, a few of them inherent to cross-sectional studies. Survey studies are valuable for estimating the burden of an event and for generating hypotheses, but they do not provide strong evidence for risk factors. It should be pointed out that the low prevalence of gonococcal infection and syphilis found in the present study prevented us from evaluating the risk factors associated with these infections. The investigation of risk factors for chlamydial infection may also have been hampered due to the low prevalence of exposure factors among the participants,

such as a history of exchanging sex for money or illegal drug use. The low report of inconsistent condom use or previous STI could be due to constraint issues related to face-to-face interviews, leading to incorrect reporting. The rate of refusal to participate, although within the predetermined limits, may have led to an underestimation of the STI prevalence due to self-exclusion procedures.

This study was a community-based survey of bacterial STI prevalence in young women attending a public health service in Central Western Brazil. Although there is substantial information about STI epidemiology in developed countries, limited data are available in developing settings. In Brazil, most STI prevalence studies have been carried out in large urban centers. We observed a high prevalence of *C. trachomatis* infection in young Brazilian women living in middle-sized cities in the central region of Brazil. Nevertheless, *N. gonorrhoeae* and *T. pallidum* infections exhibited low prevalence rates.

Although most of the volunteers reported an adequate level of education and had free access to condoms in health units, they still engaged in sexual behaviors associated with the risk for STIs. This emphasizes the need for policies directed at sexual education and STI prevention. Furthermore, awareness of the magnitude of these infections outside high risk groups is important to determine the necessity for screening strategies directed at asymptomatic young women.

In conclusion, a high prevalence of *C. trachomatis* infection was observed among sexually active young women in three middle-sized cities of Central Western Brazil. The Family Health Program is a feasible setting for adolescent recruitment, screening, and early treatment of these infections in Brazil. Asymptomatic young women represent a target population for STI control intervention strategies.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Programa Nacional de DST/Aids – Ministério da Saúde (PN-DST/Aids) and from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Dr Turchi has a research scholarship from the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) and is a member of the Institute for Health Technology Assessment – Brazil (IATS). Study sponsors had no involvement in the study design, in the collection, analysis, and interpretation of the data, in the writing of the manuscript, or in the decision to submit the manuscript for publication.

Ethics statement: This study was approved by the Ethics Review Board of the University Hospital, Federal University of Goiás. Potential participants who were not sexually experienced received counseling concerning general health issues or were referred for a medical appointment and/or vaccination when necessary. Tests for chlamydia, syphilis, and gonorrhea infections were offered free-of-charge for those participants who reported being sexually active. After being informed and providing a written agreement, the participants were referred for blood sample collection and urine self-collection. Samples were kept until the end of the study. Biological samples and questionnaires were labeled with code identification numbers in order to preserve participant anonymity. The code identification was held in reserve with the research team. At the end of the study, remaining samples were discarded and questionnaires were stored in a safe place at the Federal University of Goiás. Participants with a positive result for any of the STIs investigated, received counseling and treatment in accordance with the Brazilian Guidelines for Sexually Transmitted Diseases Treatment (Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST). Brasília, DF: Ministry of Health; 2006). Participants with a positive result were advised to inform their sexual partners and to encourage them to make an appointment at a Family Health Unit for counseling and treatment.

Conflict of interest: The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- World Health Organization. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections—2008. Geneva: WHO; 2012.
- Dean D. Chlamydia trachomatis today: treatment, detection, immunogenetics and the need for a greater global understanding of chlamydial disease pathogenesis. *Drugs Today (Barc)* 2009;45(Suppl B):25–31.
- Berman SM. Maternal syphilis: pathophysiology and treatment. *Bull World Health Organ* 2004;82:433–8.
- Machado AC, Guimarães EM, Sakurai E, Fioravante FC, Amaral WN, Alves MF. High titers of *Chlamydia trachomatis* antibodies in Brazilian women with tubal occlusion or previous ectopic pregnancy. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007;2007:24816.
- Scholes D, Stergachis A, Heidrich FE, Andrilla H, Holmes KK, Stamm WE. Prevention of pelvic inflammatory disease by screening for cervical chlamydial infection. *N Engl J Med* 1996;334:1362–6.
- Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *MMWR Recomm Rep* 2002;51(RR-15):1–22.
- Centers for Disease Control and Prevention. Chlamydia screening among sexually active young female enrollees of health plans—United States, 2000–2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009;58:362–5.
- Kamwendo F, Forslin L, Bodin L, Danielsson D. Programmes to reduce pelvic inflammatory disease—the Swedish experience. *Lancet* 1998;351(Suppl 3):25–8.
- LaMontagne DS, Pimenta JM, Fenton KA, Mallinson H, Hopwood J. Management of genital chlamydial infections at termination of pregnancy services in England and Wales: where are we now? *BJOG* 2004;111:1408–12.
- Wolff T, Shelton E, Sessions C, Miller T. Screening for syphilis infection in pregnant women: evidence for the U.S. Preventive Services Task Force reaffirmation recommendation statement. *Ann Intern Med* 2009;150:710–6.
- Ministry of Health, Brazil. Protocolo para a prevenção de transmissão vertical de HIV e sífilis. Brasília, DF: Ministry of Health; 2007.
- Araújo RS, Guimarães EM, Alves MF, Sakurai E, Domingos LT, Fioravante FC, et al. Prevalence and risk factors for *Chlamydia trachomatis* infection in adolescent females and young women in central Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;397–400.
- Guimarães EM, Guimarães MD, Vieira MA, Bontempo NM, Seixas MS, Garcia MS, et al. Lack of utility of risk score and gynecological examination for screening for sexually transmitted infections in sexually active adolescents. *BMC Med* 2009;7:8.
- Miranda AE, Szwarcwald CL, Peres RL, Page-Shafer K. Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. *Sex Transm Dis* 2004;31:542–6.
- Ministry of Health, Brazil. Sistema de Informação de Atenção Básica - SIAB. Brasília, DF: Ministry of Health; 2008. Available at: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defctohtm.exe?siab/cnv/siabGO.def> (accessed January 2014).
- Paim J, Travassos C, Almeida C, Bahia L, Macinko J. The Brazilian health system: history, advances, and challenges. *Lancet* 2011;377:1778–97.
- Barcelos MR, Vargas PR, Baroni C, Miranda AE. Genital infections in women attending a primary unit of health: prevalence and risk behaviors. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008;30:349–54.
- Codes JS, Cohen DA, de Melo NA, Teixeira GG, Leal AS, Silva TJ, et al. Screening of sexually transmitted diseases in clinical and non-clinical settings in Salvador, Bahia, Brazil. *Cad Saude Publica* 2006;22:325–34.
- Fernandes AM, Daher G, Nuzzi RX, Petta CA. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among women in a family planning clinic. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009;31:235–40.
- Soares VL, de Mesquita AM, Cavalcante FG, Silva ZP, Hora V, Diedrich T, et al. Sexually transmitted infections in a female population in rural north-east Brazil: prevalence, morbidity and risk factors. *Trop Med Int Health* 2003;8:595–603.
- Pinto VM, Szwarcwald CL, Baroni C, Stringari LL, Inocencio LA, Miranda AE. *Chlamydia trachomatis* prevalence and risk behaviors in parturient women aged 15 to 24 in Brazil. *Sex Transm Dis* 2011;38:957–61.
- Gravningen K, Simonsen GS, Furberg AS, Wilsgaard T. Factors associated with *Chlamydia trachomatis* testing in a high school based screening and previously in clinical practice: a cross-sectional study in Norway. *BMC Infect Dis* 2013;13:361.
- Lambert G, Haley N, Jean S, Tremblay C, Frappier JY, Otis J, et al. Sexual health of adolescents in Quebec residential youth protection centres. *Can J Public Health* 2013;104:216–21.
- Wiesenfeld HC, Lowry DL, Heine RP, Krohn MA, Bittner H, Kellinger K, et al. Self-collection of vaginal swabs for the detection of Chlamydia, gonorrhea, and trichomoniasis: opportunity to encourage sexually transmitted disease testing among adolescents. *Sex Transm Dis* 2001;28:321–5.
- Rodrigues MM, Fernandes PA, Haddad JP, Paiva MC, Souza Mdo C, Andrade TC, et al. Frequency of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species in cervical samples. *J Obstet Gynaecol* 2011;31:237–41.
- Martin DH, Cammarata C, Van Der Pol B, Jones RB, Quinn TC, Gaydos CA, et al. Multicenter evaluation of AMPLICOR and automated COBAS AMPLICOR CT/NG tests for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3544–9.
- Lowe P, O'Loughlin P, Evans K, White M, Bartley PB, Vohra R. Comparison of the Gen-Probe APTIMA Combo 2 assay to the AMPLICOR CT/NG assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples from Australian men and women. *J Clin Microbiol* 2006;44:2619–21.
- Miranda AE, Figueiredo NC, Schmidt R, Page-Shafer K. A population-based survey of the prevalence of HIV, syphilis, hepatitis B and hepatitis C infections, and associated risk factors among young women in Vitoria, Brazil. *AIDS Behav* 2008;12:525–31.
- van de Wijgert JH, Morrison CS, Brown J, Kwok C, Van Der Pol B, Chipato T, et al. Disentangling contributions of reproductive tract infections to HIV acquisition in African Women. *Sex Transm Dis* 2009;36:357–64.