



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**Detecção de *Chlamydia trachomatis* pela técnica de
Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em mulheres
atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Dona
Francisca Mendes, Manaus - Amazonas**

Norma Suely de Lima Freitas

Manaus / AM

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

Norma Suely de Lima Freitas

**Detecção de *Chlamydia trachomatis* pela técnica de
Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em mulheres
atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Dona
Francisca Mendes, Manaus - Amazonas**

Dissertação apresentada ao **Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas**, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologias para a Saúde e linha de pesquisa Diagnóstico de Patógenos de Doenças de Impacto Social na Amazônia.

Orientador: Prof Dr Spartaco Astolfi Filho

Co-orientadora: Prof^a Dra Cristina Maria Borborema dos Santos

Manaus / AM

2007

Ficha Catalográfica, elaborada pelo Bibliotecário Flaviano Lima de Queiroz
Diretor da Biblioteca Central/UFAM- CRB 11º/255

F866d Freitas, Norma Suely de Lima
Detecção de *Chlamydia trachomatis* pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Dona Francisca Mendes, Manaus – Amazonas / Norma Suely de Lima Freitas.—Manaus: UFAM / Centro de Apoio Multidisciplinar, 2007.

138 f. il. Col. ; 30 cm

Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Dissertação (Mestrado) – UFAM / Centro de Apoio Multidisciplinar / PMIPGB, 2007.

1. Infertilidade feminina 2. *Chlamydia trachomatis* 3. Aparelho genital feminino – doença 4. Reação em Cadeia – Polimerase (PCR) I. Astolfi Filho, Spartaco II. Título

CDU 612.663(043.3)
CDD 618.1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

NORMA SUELY DE LIMA FREITAS

**Detecção de *Chlamydia trachomatis* pela técnica de Reação em
Cadeia de Polimerase (PCR) em mulheres atendidas na
clínica de infertilidade do Hospital Dona Francisca Mendes,
Manaus - Amazonas**

Aprovado em 28 de fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, Presidente
Universidade Federal do Amazonas**

**Prof. Dr. Paulo José Benevides dos Santos
Universidade Estadual do Amazonas**

**Profa. Dra. Ione Rodrigues Brum
Universidade Federal do Amazonas**

DEDICATÓRIA

*Primeiramente a **Deus**, o nosso **Pai eterno**, por jamais ter me desamparado em todos os momentos dessa tão sonhada caminhada,*

Ao meu marido e aos meus pais pelo incentivo, apoio, carinho e paciência que sempre me ofereceram,

Dedico-lhes essa conquista com muita gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu grandioso **Deus**, que tudo torna possível, pela sabedoria e oportunidades dadas a mim;

Agradeço pelo o apoio constante e incentivo do meu esposo **Josias Coriolano de Freitas** para a conclusão deste trabalho e a sua valiosa contribuição em todas as etapas para a concretização deste sonho;

Aos meus **queridos pais**, e **irmão** por todos os sacrifícios, o encorajamento e pelo constante apoio e amor que sempre me concederam;

Ao Professor **Dr Spartaco Astolfi Filho**, meu Orientador, pela orientação e por ter me dado a oportunidade e confiança para realizar um dos meus grandes sonhos;

A minha Co-orientadora Professora **Dra Cristina Maria Borborema dos Santos**, por ter me co-orientado todas as etapas deste trabalho, pela qualidade de orientação e ensinamentos, pelo constante apoio, amizade e confiança depositada em mim, recebendo-me sempre com disposição, recebe o meu reconhecimento e gratidão;

À **Dra Dária Barroso Serrão das Neves**, Médica Ginecologista - Especialista em Reprodução Humana, responsável pela Clínica de Infertilidade Feminina do Hospital Dona Francisca Mendes – Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por ter me dado todo apoio necessário e ajuda para a obtenção das minhas valiosas amostras;

À **Dra Ione Rodrigues Brum**, Médica Ginecologista, por ter me concedida à permissão imediata e apoio total para a realização da minha pesquisa no Hospital Dona Francisca Mendes – Universidade Federal do Amazonas (UFAM);

À **Dra Ana Paula Bomfim de Borborema Alfaia**, por ter me passado informações iniciais importantes para o desenvolvimento do meu trabalho no Laboratório de Diagnóstico Molecular – Centro de Apoio Disciplinar (CAM) - UFAM;

À **Alessandra Kariza**, pela amizade e apoio nos momentos difíceis durante o desenvolvimento do trabalho;

À equipe do Laboratório de Diagnóstico Molecular - Centro de Apoio Disciplinar (CAM) - UFAM, **Cíntia Mara Oliveira, Paulo José Benevides, Júnia Raquel Dutra Ferreira, Juliana Viana Pereira, Isabel Pontes, Francisca Oliveira, Roberto Alexandre Barbosa Filho, Diego Bilby de Freitas e Évelyn Farias Costa**, pela amizade e apoio concedido durante o período experimental de Mestrado;

Ao **Felicien Vásquez**, pela ajuda na análise estatística dos resultados;

Aos Professores **Drs. José Odair, Ione Rodrigues Brum e Maria Rosa Lozano Borrás**, pelas sugestões valiosas dadas no exame de qualificação;

Aos Residentes em Ginecologia do Hospital Dona Francisca Mendes – Universidade Federal do Amazonas (UFAM) - pela ajuda na obtenção de amostras;

À **Elisa Freire Meneghini**, Professora de Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia (UFAM), por ter me dado todo apoio e incentivo, em momentos difíceis durante o meu primeiro ano de Mestrado;

Às Professoras **Dra Lídia Medina e Dra Jerusa de Andrade** pela confiança e por terem me recomendado para o meu ingresso no Programa de Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia – Universidade Federal do Amazonas (UFAM);

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Programa de Pós-Graduação em Bioecnologia (PPGBIOTEC) - UFAM e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela oportunidade e apoio financeiro concedido através de bolsa de estudos;

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

Meus Sinceros Agradecimentos

*A persistência é o caminho do
êxito.*

Chaplin

*A vida está cheia de desafios
que, se aproveitados de forma
criativa, transformam-se em
oportunidades.*

Marxwell Maltz

RESUMO

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria sexualmente transmissível, de grande impacto no sistema reprodutivo das mulheres, sendo também um importante problema para a Saúde Pública. A estimativa dos casos de infecção por *C. trachomatis* é de 90 milhões em todo o mundo. A *C. trachomatis* é considerada a bactéria sexualmente transmissível de maior prevalência, principalmente em países desenvolvidos e causa doenças do trato urogenital, linfogranuloma venéreo (LGV) e outras. Um dos fatores de risco para a infecção é a prática sexual sem proteção que é comum em adolescentes. O risco da recorrência sem uso do preservativo é comum. O diagnóstico é crítico devido à frequência de infecções assintomáticas. Em mulheres, a infecção pela *C. trachomatis* causa doença inflamatória pélvica (DIP) e as suas conseqüências podem ser a infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica. As técnicas de amplificação de ácidos nucleicos permitem utilizar pequenas quantidades de amostras para a detecção da clamídia. A escolha da técnica para detecção de *Chlamydia trachomatis* foi Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) que apresenta uma maior sensibilidade e especificidade do que os testes de imunodeteção e de cultura celular, para estimar a prevalência desse patógeno em amostras endocervicais de mulheres inférteis atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, na cidade de Manaus-AM-Brasil. A população de estudo consistiu de 106 mulheres com diagnóstico de infertilidade e foi realizado o exame médico ginecológico para a obtenção de amostras para o exame de amplificação do DNA plasmidial da *Chlamydia trachomatis*. As informações das variáveis sócio-econômico-demográficas e variáveis clínicas foram obtidas através de questionário, mediante da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido aplicado para cada paciente que participou do estudo. Para a análise estatística foi utilizado o *software* Epi-Info 3.3 para *Windows* e o nível de significância utilizado nos testes foi de 5%. A prevalência por infecção clamidial encontrada pelo método de PCR foi 52,8%. Para confirmação das bandas fracas de 241 pb encontradas na região amplificada, realizou-se a análise no gel de Poliacrilamida 6% e sequenciamento do DNA plasmidial de *Chlamydia trachomatis*. Com relação ao teste da PCR e variáveis sócio-demográficas, a análise estatística realizada demonstrou associação significativa de 5% ($p < 0,05$) apenas para renda familiar (2 a 4 salários mínimos). Quanto à

variabilidade gênica verificou-se que nas dez amostras seqüenciadas houve mínima variabilidade genética variando de 1,1% a 3,3% em relação ao plasmídio de *Chlamydia trachomatis*. Devido a alta prevalência de *Chlamydia trachomatis* encontrada neste estudo, verificou-se a necessidade de implantação de programas de detecção em massa, utilizando-se o método da PCR em amostras clínicas, por possuir maior sensibilidade e especificidade para determinar a diminuição na incidência deste patógeno em homens e mulheres sexualmente ativas.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis*, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), infertilidade feminina.

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis is a sexually transmitting bacterium that causes great impact on females reproductive health and also, constitutes an important problem for the public-health. The infection by *C. trachomatis* is estimated about 90 million cases worldwide. *C. trachomatis* is considered the most prevalent sexually transmitting bacterium mainly in developing countries and causes diseases on urogenital tract, venereal lymphogranuloma and others. One of the risks of infection is the practice without protection among adolescents. The recurring risk is common without the use of preservatives. The diagnostic is critical because most of the times the infection is asymptomatic. In females, the infection by *C. trachomatis* cause pelvic inflammatory disease (PID) and the consequences can lead to infertility, ectopic pregnancy and chronic pelvic pain. The nucleic acid amplification techniques allow us to use small amount of samples to detect Chlamydia. The choice of the technique to detect *Chlamydia trachomatis* was Polymerase Chain Reaction (PCR) that offers greater sensitivity and specificity than tests as immunoassay and bacteria culture, for estimate the prevalence of this pathogen in endocervical samples of infertile women attended in the clinic of infertility of the Dona Francisca Mendes University Hospital, in Manaus-Am-Brazil. The study population consisted of 106 women with infertility diagnosis and was realized medical gynecologic examination to obtain samples for the amplification of *Chlamydia trachomatis* DNA plasmid. Informations of the social-economic-demographs variations and clinics variations were obtained through questionnaire and through signature consent term that were applied for each patient that participated in this study. For the statistical analysis were used the software Epi-Info 3.3 for Windows and the significant level used in the tests were 5%. The prevalence found for Chlamydial infection by the PCR method were 52,8%. To confirm the weak band found of 241 pb at the amplification region, were realized the analysis on the 6% Polyacrilamid gel and DNA sequencing of DNA Chlamydial plasmid. In relation to the PCR test and social-demographs variations, the statistical analysis demonstrated significant association of 5% ($p < 0,05$) only for the family income (2 to 4 salaries). About variability of genes, were

verified at ten samples that were sequenced minimal variations from 1,1% up to 3,3% comparing to the *Chlamydia trachomatis* plasmid. Due to the high prevalence found of *Chlamydia trachomatis* in this study, were verified the necessity to implant the detections programs in large scale, using the PCR method in clinicals samples, for having the most sensitive and specificity to determine the reduction of this pathogen in sexually active men and women.

Key words: *Chlamydia trachomatis*, Polymerase Chain Reaction (PCR), female infertility.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACO	Anticoncepcional Oral
ADP	Adenosina difosfato
<i>ASRM</i>	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
CA	Câncer
<i>CDC</i>	<i>Centers for Disease Control</i> – Centro de Controle de Doenças e Prevenção
CE	Corpos Elementares
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
<i>CHSP60</i>	<i>Chlamydial Heat Shock Protein 60</i>
CR	Corpos Reticulares
DFA	Imunofluorescência Direta
DIP(A)	Doença Inflamatória Pélvica
DIU	Dispositivo Intra-Uterino
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Dideoxynucleotídeo
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIA	Enzimaimunoensaio
ELISA	Ensaio Imunoenzimático Indireto
HBV	Hepatite B
HBC	Hepatite C
HCl	Ácido Clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus Humano

<i>HSPs</i>	<i>Heat Shock Proteins</i> – Proteína de Choque Térmico
HSV-2	Herpes genital
IFD	Imunofluorescência Direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon- γ
LCR	<i>Ligase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia de Ligase
LGV	Linfogranuloma venéreo
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOMP	<i>Major Outer Membrane Protein</i> - Proteína de Membrana Externa
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia de Polimerase
PMN	Polimorfonucleares
PSF	Programa da Saúde da Família
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _r	Ácido ribonucléico ribossomal
RNA _t	Ácido ribonucléico transportador
RPM	Rotações por minuto
SIDA/AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida – <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão de Tris-HCl e EDTA
<i>Th</i>	Células T <i>helper</i> (auxiliares)
TMA	<i>Transcription Mediated Amplification Assay</i>
TPK	Solução de Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM e proteinase K 20Mg%
UI	Unidades Internacionais
UNG	Uretrite Não-Gonocócica

<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
μg	Micrograma
μL	Microlitro

1 . INTRODUÇÃO.....	8
2 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Saúde Reprodutiva da Mulher e Doenças Sexualmente Transmissíveis.....	12
2.1.1. Infecções do Trato Reprodutivo.....	14
2.1.2. Infertilidade.....	15
2.1.3. Causas da infertilidade.....	16
2.1.4. Conseqüências da Infertilidade.....	17
2.2. Etiologia Microbiana e Patogenia da Doença Inflamatória Pélvica (DIP).....	18
2.2.1. Etiologia Microbiana.....	18
2.2.2. Patogenia.....	19
2.3. Aspectos gerais das Clamídias.....	21
2.3.1. Epidemiologia.....	21
2.3.2. Biologia e o ciclo de desenvolvimento da <i>Chlamydia trachomatis</i>	25
2.3.3. Imunobiologia.....	29
2.3.4. Processo Infeccioso da <i>Chlamydia trachomatis</i>	32
2.3.5. Manifestações clínicas das principais doenças causadas pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
2.3.5.1. Cervicite.....	37
2.3.5.2. Proctite.....	38
2.3.5.3. Bartholinite.....	38
2.3.5.4. Infecção do trato genital superior feminino.....	38
2.3.5.5. Endometrite.....	39
2.3.5.6. Salpingite.....	40
2.3.5.7. Peri-hepatite (Síndrome de <i>Fitz-Hugh-Curtis</i>).....	40
2.3.5.8. Linfogranuloma venéreo.....	41
2.3.5.9. Síndrome de Reiter.....	42
2.3.5.10. Câncer cervical.....	43
2.4. Diagnóstico Laboratorial.....	43
2.4.1. Coloração pela técnica de Giemsa.....	44

2.4.2. Citologia pela técnica de Papanicolaou.....	44
2.4.3. Histopatologia.....	44
2.4.4. Pesquisa de anticorpos.....	45
2.4.5. Cultura.....	46
2.4.6. Pesquisa de antígenos (Ag).....	47
2.4.7. Pesquisa de Ácidos Nucléicos.....	48
3 . OBJETIVOS.....	52
3.1. Geral.....	52
3.2. Específico.....	52
4 . MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1. Modelo de Estudo.....	53
4.2. Universo de Estudo.....	53
4.2.1. População de Referência.....	53
4.2.2. População de Estudo.....	54
4.2.3. Critérios de Inclusão.....	54
4.2.4. Critérios de Exclusão.....	55
4.2.5. Procedimentos.....	55
4.2.6. Obtenção das Amostras.....	55
4.3. Método de Diagnóstico.....	56
4.4. Preparação das amostras para PCR.....	56
4.4.1. Extração do DNA.....	57
4.4.2. Amplificação Controle do DNA Humano (PCR).....	57
4.4.3. Sistema de PCR para Controle do DNA Humano.....	57
4.4.4. Eletroforese em Gel de Agarose 2,5%.....	58
4.5. Amplificação do DNA Plasmidial da <i>Chlamydia trachomatis</i> (PCR).....	58
4.5.1. Oligonucleotídeos (<i>PRIMERS</i>).....	58
4.5.2. Detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> por PCR.....	59

4.5.3. Sistema de PCR usando a <i>Taq</i> DNA Polimerase recombinante <i>LABTRADE</i> do Brasil Ltda para detectar DNA plasmidial da <i>Chlamydia trachomatis</i>	59
4.5.4. Sistema de PCR usando a <i>Platinum</i> ® <i>Taq</i> DNA Polymerase High Fidelity da Invitrogen <i>Life Technologies</i> para detectar DNA plasmidial da <i>Chlamydia trachomatis</i>	60
4.5.5. Eletroforese em Gel de Agarose 2%.....	60
4.6. Seqüenciamento das Amostras Amplificadas pela PCR.....	61
4.6.1. Análise das seqüências dos produtos amplificados por PCR.....	62
4.7. Metodologia Estatística.....	63
5 .RESULTADOS.....	66
5.1. Amplificação Controle do DNA Humano (PCR).....	66
5.2. Detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> por PCR.....	67
5.3. Eletroforese em gel de Poliacrilamida a 6% de produtos amplificados com bandas fracas.....	72
5.4. Prevalência de <i>Chlamydia trachomatis</i>	73
5.5. Características da população do estudo.....	75
5.5.1. Característica da população do estudo quanto ao resultado do PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>	77
5.6. Sequenciamento dos produtos amplificados por PCR.....	83
6 . DISCUSSÃO.....	85
6.1. Importância da enzima no diagnóstico molecular.....	85
6.2. Análise da prevalência e condições – sócio econômicas e demográficas da população do estudo.....	87
6.3. Análise de amostras com bandas fracas.....	92
6.4. Estudo de variabilidade genética dos fragmentos amplificados.....	92
7 . CONCLUSÃO.....	93
8 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
9 . OBRAS CONSULTADAS.....	112

10 . ANEXOS.....	113
------------------	-----

Lista de Figuras

Figura 1 – Disseminação da <i>C. trachomatis</i> do fundo de saco vaginal e do canal endocervical para as tubas uterinas.....	19
Figura 2 – Estimativa de casos de infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	21
Figura 3 – Ciclo de desenvolvimento da <i>Chlamydia trachomatis</i>	27
Figura 4 – Infecção do trato genital feminino pela <i>Chlamydia trachomatis</i>	34
Figura 5 – Desenvolvimento do Ciclo da <i>Chlamydia trachomatis</i>	34
Figura 6 – Gravidez ectópica.....	35
Figura 7 – Representação esquemática de um ciclo de PCR.....	50
Figura 8 – Escova <i>cyto-brush</i> para coletas das amostras do endocérvice.....	56
Figura 9 – Perfil eletroforético em gel de agarose 2,5%	56
Figura 10 – Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0%.....	67
Figura 11 – Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0%.....	68
Figura 12 – Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0%.....	69
Figura 13 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0%.....	70
Figura 14 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0%.....	71
Figura 15 – Perfil eletroforético em gel de Poliacrilamida 6,0%.....	72
Figura 16 – Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0%.....	122
Figura 17 – Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0%.....	123
Figura 18 – Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0%.....	124

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Taxas de prevalência da infecção pela <i>Chlamydia trachomatis</i> em mulheres brasileiras relatadas nas literaturas científicas.....	23
Tabela 2 - Sorotipos da <i>Chlamydia trachomatis</i> e sua associação com doenças humanas.....	32
Tabela 3 - Distribuição segundo as variáveis sócio-demográficas das mulheres com infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes da cidade de Manaus - AM	76
Tabela 4 - Descrição do número de parceiros sexuais das mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, na cidade de Manaus – AM.....	77
Tabela 5 - Distribuição segundo gravidez ectópica das mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, na cidade de Manaus – AM.....	78
Tabela 6 - Descrição do exame especular das mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, na cidade de Manaus – AM.....	78
Tabela 7 - Distribuição segundo as variáveis sócio-demográficas em relação ao resultado do PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i> das mulheres com infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes da cidade de Manaus – AM.....	80
Tabela 8 - Distribuição segundo as variáveis clínicas em relação ao resultado do PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i> das mulheres com infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes da cidade de Manaus – AM.....	82
Tabela 9 - Variações de nucleotídeos nas amostras seqüenciadas.....	83

Lista de Quadros

Quadro 1 – Grupos de indivíduos com alto risco de DST por clamídia..... 24

Quadro 2 – Comparação dos produtos amplificados da PCR das amostras 17, 20, 22, 29, 33, 36, 71, 74, 75 e 104 com a seqüência do plasmídio de *Chlamydia trachomatis*84

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição segundo o resultado do PCR utilizando-se a <i>Platinum[®] Taq DNA polimerase High Fidelity</i> para <i>Chlamydia trachomatis</i>	73
Gráfico 2 - Distribuição segundo o resultado do PCR utilizando-se a <i>Taq DNA polimerase recombinante Labtrade do Brasil</i> para <i>Chlamydia trachomatis</i>	74

1. INTRODUÇÃO

As infecções por transmissão sexual são a principal causa global de enfermidades, infertilidade, incapacidades e morte, com severas conseqüências médicas e psicológicas para milhões de homens, mulheres e crianças. Em 1999, a World Health Organization (WHO) estimou 340 milhões de novos casos de doenças sexualmente transmissíveis (DST) curáveis, numa população entre 15 e 49 anos de idade. Dez (10) a doze (12) milhões destes casos ocorreram no Brasil e o maior número de novas ocorrências de infecções ocorreram na região Sul e Sudeste da Ásia, seguindo Sahara Africana, América Latina e o Caribe (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WHO, 2001).

Há mais de 40 tipos de patógenos que são transmitidos pela relação sexual, incluindo Clamídia, Gonorréia, Hepatites B e C, Herpes, Papiloma Vírus, Sífilis, Trichomonas e Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (POPULATION COUNCIL, 2001). Muitos deles são curáveis através do uso correto de antimicrobianos nos tratamentos. Entretanto, mesmo com a viabilidade de tratamentos efetivos, as infecções bacterianas transmitidas pela relação sexual ainda são a principal preocupação da saúde pública nos países industrializados e em desenvolvimento. A magnitude exata das infecções sexualmente transmissíveis ainda é desconhecida, pois o sistema de dados em alguns países, nem sempre é fidedigno ou está na sua forma incompleta. Apenas uma parte da população sintomática procura cuidados de saúde e poucos são os casos registrados (WHO, 2001). As infecções sintomáticas e assintomáticas poderão desenvolver sérias complicações e conseqüências para os indivíduos. Em países em desenvolvimento, as doenças sexualmente transmissíveis e as suas complicações estão entre as maiores categorias de doenças onde os adultos procuram auxílio do serviço de saúde (WHO, 2001). De acordo com a Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST)/AIDS (1999); Ministério da Saúde (2005) e Sardinha et al. (1999) são escassos os dados epidemiológicos relativos as DST no Brasil e, especialmente, no estado do Amazonas devido a sub-notificação de casos. Com isso, não existem dados que demonstrem

a verdadeira situação das infecções por *Chlamydia trachomatis*. Segundo o Ministério da Saúde (2006), apenas a AIDS, HIV na gestante e criança, sífilis na gestante e a sífilis congênita são notificadas compulsoriamente. De acordo com a Coordenação Nacional de DST/AIDS (1999), são considerados raros os serviços públicos que oferecem pesquisa para DST, enquanto que nos serviços privados, só é realizada a pesquisa em casos sintomáticos.

De acordo com a WHO (1995), na América Latina e Caribe são esperados que entre 7% a 14% da população sexualmente ativa, (3,5 a 7% da população geral), venha adquirir sífilis, gonorréia, clamídia ou tricomoníase ao longo de um ano.

Desde a década de 80, a infecção pela *C. trachomatis* é considerada como uma das DST mais freqüentes em todo mundo (OMS, 2001). A *C. trachomatis* é causa mais comum de doença de transmissão sexual bacteriana e facilita também o contágio do vírus HIV (GALVIN e COHEN, 2004). A infecção por clamídia é uma preocupação importante da saúde pública devido os efeitos desfavoráveis que podem ocorrer com relação à reprodução humana (WHO, 2001). Em mulheres, causa Doença Inflamatória Pélvica (DIP) e as conseqüências devido aos longos períodos de infecção ocasiona infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005).

Várias regiões do mundo demonstraram um acréscimo no número de pessoas infectadas. Este acréscimo reflete em parte, no progresso do diagnóstico e/ou mudanças no comportamento sexual (GOTZ et al., 2002).

A infecção por clamídia é considerada como a doença sexualmente transmissível mais comum nos Estados Unidos entre adolescentes do sexo feminino e jovens senhoras (MMWR/CDC, 2004). Aproximadamente 5% a 14% de jovens nas idades de 16 a 20 anos e 3% a 12% de mulheres de 20 a 24 anos de idade estão infectadas por clamídia (MMWR/CDC, 2004). Em 2005, 976.445 casos de infecções por clamídia foram comunicados ao “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC). Muitos casos não são registrados ou diagnosticados e a estimativa é de 2,8 milhões de novos casos de infecção por clamídia em cada ano (WEINSTOCK et al., 2004). No Reino Unido e Estados Unidos da América do Norte (EUA), pesquisas realizadas de endocervicite clamidiana em gestantes mostram uma incidência entre 2% a 47% (FRIAS et al., 2001). Estudos realizados no Brasil, em diferentes grupos populacionais e por diversas metodologias, mostram uma incidência entre 2,1% e 31,5% ao se investigar infecção genital por *C. trachomatis*. Na região Amazônica, há poucos dados que demonstram a situação real da infecção por clamídia. Ishak e Ishak (2001) realizaram um estudo soropidemiológico de

populações indígenas da Amazônia e constataram uma prevalência de anticorpos para clamídia de 48,6%. Em Manaus, Alencar; Ferreira e Loureiro (1993) constataram uma prevalência de 27,1% de positividade para clamídia pela técnica de imunofluorescência direta. Já Santos et al. (2003) e Alfaia (2005) encontraram uma positividade de 20,6% e 11% num estudo realizado com mulheres sexualmente ativas e gestantes, usando a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), respectivamente.

Segundo a WHO (2001), 70% a 75% de mulheres infectados por *C. trachomatis* são assintomáticas. Portanto, o diagnóstico e tratamento nas pessoas infectadas é essencial para a prevenção da DIP, infertilidade e gravidez ectópica. Entre 8% e 12% de casais ou 50 a 80 milhões de pessoas no mundo passam de alguma forma a experiência de infertilidade durante o seu período reprodutivo. Aproximadamente 5% dos casais são inférteis devido algum problema anatômico, endocrinológico, genético ou fatores imunológicos (WHO, 2001). Segundo Abdelmassih (2006), no Brasil, aproximadamente oito milhões de casais possuem problemas de infertilidade. A DIP é a principal causa de infertilidade. Maioria dos casos da DIP é causada pela *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Estudos realizados sobre a prevalência de *C. trachomatis* em pacientes com DIP demonstraram que mais da metade dos casos são causados pela clamídia (PAAVONEN e LEHTINEN, 1996). Kohl (1994) relatou que houve um declínio na incidência da infecção gonocócica em países ocidentais, enquanto que o número de infecções clamidiais aumentou (EGGER et al., 1998). Outros estudos indicaram que a incidência da infertilidade causada pelo fator tubário é aproximadamente 23% após um episódio de DIP, aproximadamente 35% após dois episódios, e acima de 75% após três episódios (ABDELMASSIH, 2006).

A estimativa de custo para os casos de infecções por clamídia nos Estados Unidos é mais de US\$ 2,4 bilhões por ano (ENG e BUTLER, 1997). O *National Health Service* (NHS) gasta mais que £ 50 milhões (US\$ 79 milhões; € 72 milhões) anualmente para tratar infertilidade feminina associada à infecção clamidiana (TEMPLETON, 2002). No Brasil, não há um cálculo oficial da prevalência da infecção (SEADI et al., 2002). Entretanto, no período de janeiro de 2003 até outubro de 2004, foram internadas 93.040 mulheres com DIP em todo o Brasil, representando custo total de R\$ 25.462.880,53, considerando apenas o tratamento hospitalar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Atualmente, cerca de oito milhões de casais brasileiros necessitam de algum tipo de tratamento para fertilização (NUNES, 2003). Segundo Abdelmassih (2006), dentro desses oito milhões de casais brasileiros com problemas de infertilidade, 90% ficam

sem receber tratamento adequado, pois não há custeio por parte do serviço público de saúde.

Devido aos altos custos dos tratamentos para fertilização – entre R\$ 2 mil a R\$20 mil, tornam-se de difícil acesso. No Brasil, somente 0,8% das mulheres que precisam ser submetidas à reprodução assistida conseguem atendimento nos hospitais, clínicas e consultórios especializados. Nos países desenvolvidos, com exceção dos Estados Unidos, os hospitais públicos oferecem tratamento de reprodução assistida total ou parcialmente gratuito. Na Dinamarca, 43% das mulheres que precisam de ajuda para engravidar recebem assistência. Na Bélgica, esse índice é de 28%. Já em países como Chile e Argentina, apenas 2% das mulheres são beneficiadas (NUNES, 2003). Os casais que têm condições de pagar pelo tratamento recorrem a uma clínica privada. Os governos da América latina, inclusive do Brasil, não financiam os tratamentos para infertilidade por uma questão de dificuldade financeira (NUNES, 2003).

Segundo as estimativas do IBGE para 1º de Julho de 2005, a cidade de Manaus - AM, possui uma população feminina de 865.251 (IBGE, 2006). Não há dados sobre o número de casos de infecção por *C. trachomatis* em mulheres com diagnóstico de infertilidade nesta região, o que justifica a realização do presente estudo. Por não existirem dados epidemiológicos nesta região relativos à infecção por clamídia e infertilidade feminina, este estudo foi originado a partir da necessidade de conhecer a realidade local dessa infecção em mulheres que apresentam problemas de infertilidade.

Com as informações relatadas acima e considerando que a infecção por clamídia em mulheres pode levar a sérias complicações como a infertilidade, verificamos a necessidade de aprofundar esse estudo usando como método de diagnóstico de escolha a técnica molecular da reação em cadeia de polimerase (PCR).

A PCR é considerada, atualmente, como um teste mais sensível para diagnóstico de *C. trachomatis*, pois é altamente sensível e específico quando comparado com outros testes, como cultura de células e o teste de imunofluorescência indireta, na qual pode resultar em reações cruzadas com outras espécies de clamídias (HAMDAD et al., 2004; KELLOG; BAILLARGEON; LUKEFAHR, 2004).

Portanto, a clamídia permanece na sua forma característica, como uma ameaça para a saúde da mulher, e por isso há uma necessidade de um diagnóstico mais preciso entre as mulheres sexualmente ativas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, 2003).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Saúde Reprodutiva da Mulher e Doenças Sexualmente Transmissíveis

Durante a última década, tem ocorrido um aumento de casos de infecções de transmissão sexual na Europa (ADLER, 2003; GERBASE; ROWLEY e MERTENS 1998; HANSEN; NICOLL e HAMERS, 2002; WONG e PERRIN, 2003). As taxas de doenças sexualmente transmissíveis (DST) têm aumentado, mesmo com a conscientização geral da população e com a implantação de novas técnicas de diagnósticos. De acordo com Crosby et al. (2004); WHO (2001), a elevação dessas taxas está associada mais com o comportamento sexual entre os jovens. A tendência de muitos jovens é iniciar a atividade sexual numa idade precoce (início da atividade sexual com 13 anos de idade) e ter contato com vários parceiros sexuais. Dentre a forma mais comum de se contrair uma DST é através da prática sexual não segura com parceiro já estando infectado. São considerados comportamentos de risco para contrair uma DST:

- Manter relação sexual com vários parceiros sem o uso de uma barreira de proteção eficaz (condom);
- Ter um parceiro que possui vários outros parceiros sexuais;
- Manter relação sexual com profissional de sexo, sem o uso devido de condom;
- Continuar manter relação sexual mesmo apresentando sintomas de infecção sem o uso do preservativo;
- Contato com parceiros sexuais que fazem uso comumente de drogas ilícitas e tornando-se vítimas de violências como abusos sexuais;
- O não tratamento para a infecção de uma DST;
- Não seguir corretamente a instrução medicamentosa prescrita pelo médico para tratamento de uma DST ou não terminar o tratamento no tempo certo.

Segundo Dailard (2003); Ministério da Saúde (2006); Miranda (2003); WHO (2005), no final da década de 90, a OMS publicou dados de estimativa mundial relatando que praticamente a metade dos adultos que contraíram alguma DST tinham sido mulheres e que a estimativa total anual de novos casos de DST curáveis foram de 340 milhões. Os casos de DST curáveis foram distribuídos nas seguintes formas, sendo que muitas mulheres apresentaram mais de uma doença ao mesmo tempo:

- Sífilis – 6,5 milhões;
- Gonorréia – 31,5 milhões;
- Clamídia – 47,0 milhões;
- Trichomonas – 80,0 milhões.

Outros milhões de DST não curáveis (virais) que ocorrem anualmente são:

- Herpes genital (HSV-2);
- Hepatites B (HBV) e C (HBC);
- Papilomavirus humano (HPV);
- Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) responsável pela Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou AIDS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As doenças de transmissão sexual em mulheres não são facilmente identificadas ou curadas pelas as seguintes razões:

- Mais de 50% das doenças transmitidas por via sexual em mulheres são assintomáticas;
- Dificuldades no diagnóstico e métodos diagnósticos sensíveis e específicos o suficiente para diagnosticar DST;
- Dificuldade de acesso de mulheres aos serviços de saúde (UNITED NATIONS, 1998).

Os resultados devido ao surgimento das complicações oferecem muitas vezes seqüelas irreparáveis na saúde da mulher causando morbidade e mortalidade. Seguem as seguintes observações que devem ser consideradas:

- Doenças Sexualmente Transmissíveis causam complicações relacionadas a gravidez, sepsis, abortos espontâneos, partos prematuros e doenças congênitas;

- De todas as mortes maternas, 1-5% são devidas a gravidez ectópica, a maioria atribuídas às DST;
- 35% de casos da morbidade de pós-parto são atribuídas às DST;
- Praticamente 2/3 dos casos de infertilidade em mulheres são atribuídas às DST;
- De todos os exames ginecológicos, 17-40% são devidos ao processo inflamatório pélvico, sendo maioria pela transmissão sexual;
- Mundialmente, as doenças por transmissão sexual em mulheres são 5 vezes maiores em relação ao homem (UNITED NATIONS, 1998).

Segundo WHO (2001) na maioria das vezes, a infecção por uma DST não traz nenhuma sintomatologia. Tanto homens quanto mulheres poderão permanecer infectados durante muitos anos sem apresentar sintomas. Durante todo o período assintomático, a infecção poderá causar sérios danos, principalmente no aparelho reprodutor em ambos os sexos.

2.1.1. Infecções do Trato Reprodutivo

Infecções do trato reprodutivo incluem tanto os que são transmitidas por via sexual quanto àquelas que o não são. A infecção de transmissão não sexual poderá ser resultante de infecções endógenas causadas por crescimento anormal de microrganismos que normalmente são encontradas na vagina, como a vaginose bacteriana ou vulvovaginite pela candidíase, ou infecções exógenas causadas por falta de segurança da prática ginecológica e obstétrica e pobre higiene genital (WHO, 2002; 2005).

Biologicamente, mulheres são mais susceptíveis para maioria das infecções transmitidas pelo ato sexual do que os homens. Esta explicação deve-se a anatomia da vagina e superfície da mucosa exposta para uma grande quantidade de patógenos durante o ato sexual. Mulheres jovens são mais susceptíveis devido à imaturidade da cérvix e menor produção do muco vaginal, passando-se a oferecer uma menor proteção efetiva contra os agentes infecciosos (WHO, 2002; 2005). Segundo Biro (1992); Miranda (2003), adolescentes que entram na puberdade mais cedo podem iniciar precocemente a vida sexual. Nos primeiros anos após menarca, o epitélio colunar se estende na superfície da cérvix uterina (ectocérvix) e o epitélio colunar é considerado mais susceptível

do que o epitélio escamoso à infecção pela gonorréia e clamídia (HARRISON; COSTIN e MEDER, 1985; MIRANDA, 2003). A maioria das mulheres com infecções de transmissão sexual tendem apresentar-se assintomáticas e, portanto, não buscam tratamento. O não diagnóstico e não tratamento de infecções transmitidas pela relação sexual são as causas da cronicidade da infecção e numerosas complicações sofridas pelas mulheres (WHO, 2002; WYRICK, 2002).

2.1.2. Infertilidade

Definições de infertilidade geralmente são referidas às mulheres, devido à inabilidade da mulher de poder conceber mesmo quando a causa provém do sexo masculino. Segundo Borges et al. (2005), a infertilidade conjugal é a incapacidade de concepção após um ano de vida sexual ativa e regular distribuídas ao longo do ciclo menstrual, sem uso de qualquer método contraceptivo. As classificações de infertilidade usadas por Borges et al. (2005); Taylor (2003); WHO (1991) e Yao e Schust (2005), são as seguintes:

- **Infertilidade Primária:** A mulher que não conseguiu conceber após um ano de exposição a gravidez e não houve gestações prévias.
- **Infertilidade Secundária:** A mulher teve uma concepção anteriormente, embora não necessariamente com um nascido vivo e não consegue conceber mais posteriormente.

De acordo com Borges et al. (2005), a relação idade e infertilidade são bastante conhecidas. As lesões tubárias, cada vez mais se tornam comuns, principalmente em pacientes com idade avançada em termos reprodutivos, e com isso o restabelecimento da fertilidade se torna cada vez mais difícil. Segundo a *American Society for Reproductive Medicine (ASRM)* (2000), além da idade da mulher, existem outros fatores que levam à infertilidade: medicamentos, consumo excessivo de álcool, fumo, droga, exposição a certos componentes tóxicos, hereditariedade, excesso de peso ou doenças.

Conclui-se com isso que as mudanças ocorridas na sociedade, tais como nível sócio-econômico e grau elevado de instrução com a opção de conceber filhos tardiamente, afetaram profundamente o potencial da infertilidade do homem e da mulher (BORGES et al., 2005; VAN BALEN; VERDURMEN e KETTING, 1997).

Informações relacionadas à infertilidade geralmente são baseadas de acordo com dados de serviços de saúde. Ainda há poucos estudos especificamente focalizando a infertilidade. Os dados de infertilidade são considerados subestimados em países em desenvolvimento (DAAR e MERALI, [s.d.]).

2.1.3. Causas da infertilidade

A infertilidade atinge 10 a 15% dos casais que se encontram na idade reprodutiva, sendo as doenças do trato genital feminino responsáveis por 50 a 60% dos casos, ao passo que 40 a 50% estão relacionados a fatores masculinos (BORGES et al., 2005).

WHO (2002), relatou através de estudos que a infertilidade primária é mais comum que a infertilidade secundária, contabilizando 60% ou mais de todos os casos. Mulheres que não conseguiram conceber em nenhum momento ou não possuem filhos vivos são mais propensas a procurarem serviços de saúde para diagnóstico e tratamento em relação às mulheres que tiveram um ou mais filhos.

Em relação às causas femininas destacam-se os fatores tubo-peritoneais, associados à doença inflamatória pélvica, endometriose, cirurgias anteriores, abortos sépticos, apendicite com peritonite e gravidez ectópica (BORGES et al., 2005).

Distúrbios ovulatórios emergem como a mais freqüente causa de infertilidade primária. Patologias cervicais e outras causas como endometriose e leiomioma uterino são também causas comuns de infertilidade (KHALAF, 2003; WHO, 2002).

A presença de salpingites, endometrites e aderências anexiais, com surgimento de danos irreversíveis à região pélvica, têm como consequência a infertilidade tubária. A *C. trachomatis* é também um agente etiológico importante e responsável por infertilidade tubária. É considerada uma das causas mais importantes de DST, pois é responsável pelo linfogranuloma venéreo, pelas uretrites não gonocócicas e pela doença inflamatória pélvica (DIP). Estima-se que aproximadamente 25% das pacientes com salpingite por *C. trachomatis* tornam-se inférteis. Uma vez ocorrida uma salpingite, a trompa fica

mais susceptível a reinfecções por clamídia ou por outros patógenos do meio vaginal, devido aos danos ocorridos na mucosa durante a primeira infecção (ABDELMASSIH, 2006).

A relação entre infertilidade secundária e infecções de origem sexual é considerada subestimada (WHO, 2002). A infertilidade causada pela tuba uterina é comum em mulheres que apresentam infertilidade secundária e em populações femininas que apresentam alta prevalência de doenças sexualmente transmissíveis. O funcionamento adequado das tubas uterinas é pré-requisito para a fertilidade. As tubas uterinas são órgãos altamente especializados e possuem a função de receber e transportar o óvulo, espermatozóide e embrião. As tubas uterinas são vulneráveis às infecções e dano cirúrgico, podendo com isso, afetar o seu devido funcionamento (PAAVONEN, 2004).

Sabe-se também que existem vários sistemas regulatórios, que funcionam por meio de conexões nervosas, neurotransmissores e hormônios, que influenciam os mecanismos reprodutivos. Estudos apontam que o estresse emocional pode influenciar nos mecanismos que regulam a fase folicular do ciclo menstrual diminuindo as chances de fertilidade (DOBSON e SMITH, 2000). A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal induzida pelo estresse, interfere o folículo ovariano de receber um adequado suporte de gonadotrofinas resultando em anovulação (MOUREIRA et al., 2005).

Uma nota da *American Society for Reproductive Medicine* (2000), diz o seguinte: “fazendo-se uma cuidadosa anamnese poder-se-ão identificar sintomas ou sinais que sugiram a causa específica da infertilidade e assim, poder-se-á chegar ao diagnóstico de possíveis fatores responsáveis pelo desencadeamento da infertilidade”.

2.1.4. Conseqüências da Infertilidade

Diversos estudos demonstram que mulheres inférteis expressam sentimentos de frustração, perda de auto-estima, além de depressão e ansiedade (GERRITY, 2001).

O tratamento da infertilidade implica em vários exames e tratamentos médicos de longa duração, que podem manifestar diversos sintomas psicológicos, sendo de maior frequência a ansiedade e a depressão, raiva, frustração, dificuldades nos relacionamentos sexuais e isolamento familiar/social. Esses sintomas acometem entre 25 a 60%

das pessoas consideradas inférteis. A ansiedade geralmente surge pela natureza estressante dos tratamentos e pelo temor de não conseguir conceber, estando a depressão mais relacionada ao resultado negativo do tratamento (GUERRA et al., 1988).

Portanto, a infertilidade tem implicação profunda a nível social, emocional e econômico. Inclusive, estudos realizados em vários países, incluindo os países em desenvolvimento traçaram as conseqüências da saúde mental em mulheres inférteis (AGHANWA; DARE e OGUNNIYI, 1999; PAPREEN et al., 2000; UNISA, 1999). Um estudo realizado na Nigéria em 1999, comparando o estado da saúde mental de 37 mulheres com infertilidade e 37 controles, encontrou significativa proporção de mulheres inférteis com depressão e desordens de ansiedade (AGHANWA; DARE e OGUNNIYI, 1999).

2.2. Etiologia Microbiana e Patogenia da Doença Inflamatória Pélvica (DIP)

2.2.1. Etiologia Microbiana

Vários microrganismos têm sido envolvidos como agentes etiológicos em Doença Inflamatória Pélvica (DIP), e a maioria dos casos de DIP estão associados com mais de um tipo de microrganismo (ESCHENBACH et al., 1975; 1988; RICE e SCHACHTER, 1990; WHO, 2005). Esses agentes etiológicos ascendem ao trato genital superior, carregados pelos espermatozoides ou raramente pelos vasos linfáticos (SATO et al., 2005). A *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e uma variedade de bactérias anaeróbicas e aeróbicas são reconhecidas como agentes etiológicos de DIP nos Estados Unidos (GLATT; McCORMACK e TAYLOR, 1990). Mais comumente as bactérias anaeróbicas podem ser isoladas do canal genital em mulheres com salpingite (ESCHENBACH et al., 1975). A proporção de mulheres com DIP infectadas com *C. trachomatis* varia bastante, provavelmente devido às variações que ocorrem entre a população estudada, diferenciação no intervalo de tempo de investigação, variações na severidade da infecção e diferentes métodos aplicados na investigação microbiana (CATES; ROLFS e ARAL, 1990).

2.2.2. Patogenia

Acredita-se que a Doença Inflamatória Pélvica é resultado da distribuição de microrganismos no canalículo do endocérvice para o endométrio, mucosa da tuba uterina, ovários e o peritônio (RICE e SCHACHTER, 1990; SATO et al., 2005; WHO, 2005) (Figura 1).

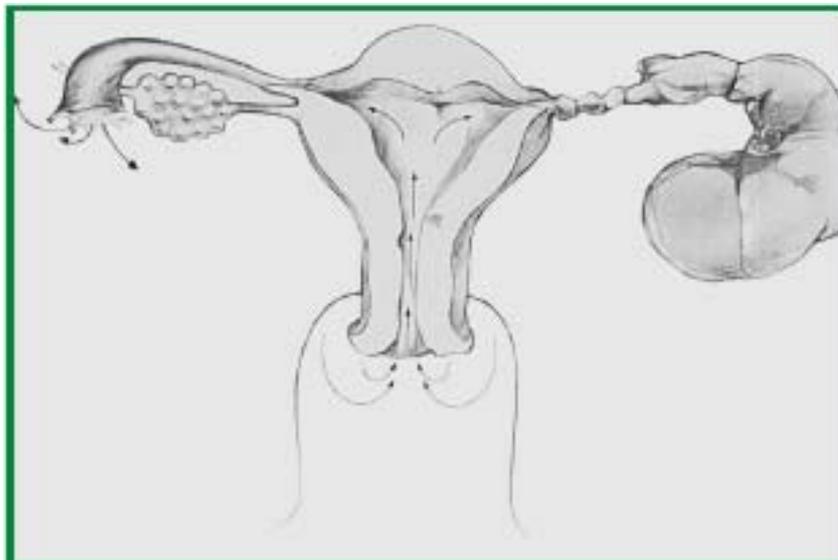


Figura 1 – Disseminação da *C. trachomatis* do fundo de saco vaginal e principalmente do canal endocervical para as tubas uterinas.

FONTE: PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005.

A patogênese das seqüelas em longo tempo da infecção por clamídia ainda é pouco entendida, mas sabe-se que entre 10% a 40% das mulheres com cervicites por clamídia e não tratadas clinicamente desenvolvem sintomas de DIP (PLATT; RICE e McCORMACK, 1983; STAMM et al., 1984; TOTH et al., 2000). Seqüelas de DIP como obstrução tubária e aderências pélvicas podem acarretar infertilidade, gravidez ectópica e dor pélvica crônica. A gravidade dessas seqüelas está relacionada com a duração da doença (SATO et al., 2005; WHO, 2005).

Há quatro fatores que podem contribuir para a ascensão da bactéria e/ou podem estar associados à patogênese da infecção no trato genital superior: 1) O uso do Dispositivo Intra-Uterino (DIU) pode facilitar a distribuição bacteriana encontrada na vagina para a cérvix; 2) Alterações hormonais, como a menstruação, podem alterar a barreira mecânica na região cervical, interferindo com isso na prevenção da ascensão bacteriana para as tubas uterinas (SWEET et al., 1986; WHO, 2005); 3) O refluxo menstrual pode favorecer a ascensão para as tubas uterinas e peritônio e 4) Os microrganismos poderão ter fatores de virulência associados a patogênese da clamídia e gonococo (BRUNHAM et al., 1987; RICE e SCHACHTER, 1990).

De acordo com Abdelmassih, (2006); Ministério da Saúde (2005); WHO (2005), o uso de dispositivos intra-uterinos são fatores importantes nas infecções ascendentes. Diversos estudos anteriores sugerem que os DIUs causam a infertilidade. Porém, já foi demonstrado recentemente que pacientes nuligrávidas e usuárias de DIUs de cobre não possuem associação com a infertilidade tubária e com a duração do uso (HUBACHER; LARA-RICALDE; TAYLOR, 2001). O cálculo do risco de DIP em pacientes usuárias de DIU mostrou que o risco estimado é baixo (0,15%), mesmo em populações apresentando alta prevalência de DIP (SHELTON, 2001).

Segundo Land et al. (2002), pacientes submetidas aos procedimentos ginecológicos como instrumentação uterina (histerossalpingografia, laparoscopia, etc.) podem ser consideradas de risco para infecções pélvicas por *C. trachomatis*, por originar-se por via ascendente da endocérvice ou ser reativadas a partir de microrganismos que persistem no trato genital após infecções anteriores.

Portanto, há uma relação entre o colo uterino e lesão tubária, já que o canal do colo do útero é considerado a principal porta de entrada de microrganismos que provocam salpingites. Na maioria das vezes essas infecções são provenientes de doenças sexualmente transmissíveis assintomáticas podendo causar lesões tubárias graves (BORGES et al., 2005).

2.3. Aspectos gerais das Clamídias

2.3.1. Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a estimativa de novos casos de infecção pela *C. trachomatis* em adultos era de 92 milhões em 1999, sendo que 9,5 milhões ocorreram na América Latina e Caribe (Figura 2). Nas estimativas dos Centros de Controle de Doenças e Prevenção (CDC), nos Estados Unidos da América (EUA), existem mais casos novos diagnosticados de infecção pela clamídia do que qualquer outra DST, incluindo sífilis, gonorréia, condiloma acuminado, herpes e aids. Passos; Varella e Miranda (2005) relataram uma estimativa de ocorrência entre 3 e 4 milhões de casos novos de clamídia a cada ano nos Estados Unidos, enquanto que Guaschino e Seta (2000) referiram-se a uma estimativa de 10 milhões de novos casos na Europa.

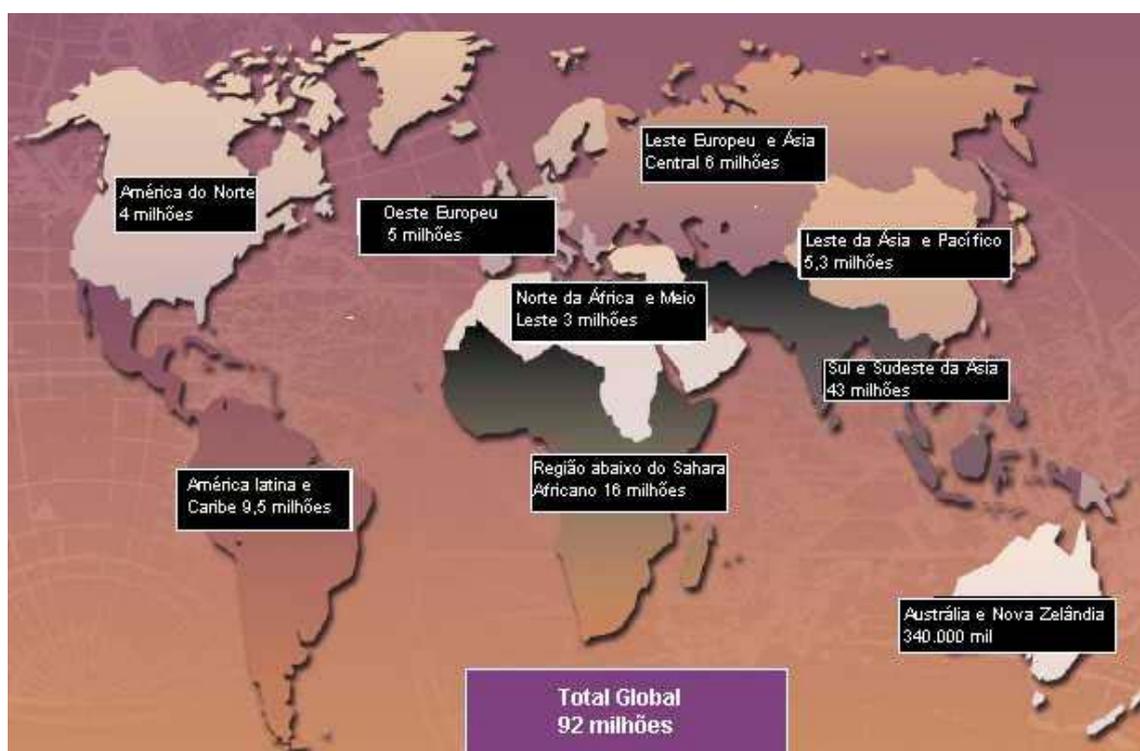


Figura 2 – Estimativa de casos de infecção pela *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: WHO, 1999.

Estudos apontam que a infecção por clamídia é mais comum entre mulheres do que em homens. Nos Estados Unidos, numa população de 100.000 mulheres, a taxa de casos de infecção por clamídia encontrou-se três vezes maior em comparação aos homens. Adolescentes do sexo feminino nas idades de 15 a 19 anos apresentaram taxas mais elevadas de clamídia (2.796,6 / 100.000 habitantes), seguindo as jovens com idades de 20 a 24 anos (2.691,1 / 100.000 habitantes) (CDC, 2006).

Mulheres afro-americanas são também bastante afetadas pela infecção clamidiana. Em 2005, foram reportadas 1.729,0 casos de infecção por clamídia numa população de 100.000 mulheres negras. Esse dado demonstrou ser 7 vezes maior em relação as mulheres brancas (237,2) e mais de que o dobro ao comparar com mulheres hispânicas (733,2) (CDC, 2006).

De acordo com CDC (2006), 40% das mulheres que não recebem tratamento para a infecção clamidial, desenvolverão DIP, e 20% delas poderão tornar-se inférteis.

Atualmente, no Brasil, não há muitos dados ou informações que demonstrem a situação real da infecção pela *C. trachomatis* (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005). O número reduzido de dados sobre clamídia em nosso meio se deve por alguns fatores, principalmente devido à própria assintomatologia clínica nas mulheres e a dificuldade de acesso aos exames laboratoriais que, geralmente são tidos como caros e muitas vezes de difícil realização. Segundo Passos; Varella e Miranda (2005), os dados publicados nos artigos científicos sobre a prevalência dessa infecção ainda são estudos isolados Tabela 1.

Prevalência	Autor	N	Ano	Local	População	Método diagnóstico
18,0%	Gonçalves Raddi et al.	142	1993	Araraquara/SP	Ambulatório ginecologia	Cultura endocérvice
27,1%	Alencar et al.	199	1993	Manaus/AM	Serviços DST	IFD
9,0%	Amaral et al.	122	1995	São Paulo/SP	Pré-natal	ELISA
2,1%	Simões et al.	328	1997	Campinas/SP	Pré-natal	IFD ¹
6,6%	Faundes et al.	407	1998	Campinas/SP	Planejamento familiar	IFD
8,4%	Moherdau et al.	348	1998	Multicêntrico ²	Serviços DST	IFD
8,5%	Lowndes et al.	796	1999	Rio de Janeiro/RJ	Ambulatório ginecologia	IFD/ELISA
13%	Miranda et al.	119	2000	Vitória/ES	Penitenciária feminina	ELISA
8,9%	Melles et al.	189	2000	São Paulo/SP	Ambulatório ginecologia	Cultura endocérvice
18,5%	Varella et al.	108	2000	Pirai/RJ	Ambulatório ginecologia	ELISA
5,0%	Frias et al.	100	2002	Teresópolis/RJ	Clínica particular	ELISA
3,2%	Bastos et al.	123	2002	Rio de Janeiro/RJ	Clínica particular	ELISA
20,2%	Smith et al.	424	2002	São Paulo/SP	Ambulatório CA cervical	IFD
11,4%	Miranda et al.	149	2002	Vitória/ES	PSF ³ - Adolescentes	LCR ⁴
19,6%	Araújo et al.	296	2002	Goiânia/GO	Ambulatório ginecologia	PCR ⁵
11,4%	Mirana et al.	155	2002	Porto Alegre/RS	PSF – Mulheres	PCR ⁵
20,7%	Santos et al.	121	2003	Manaus/AM	Serviços DST	PCR ⁵
11,0%	Alfaia, A.P.B.B.	100	2005	Manaus/AM	Hospital Dona Francisca Mendes Pré-Natal	PCR ⁵

Tabela 1 – Taxas de prevalência da infecção pela *Chlamydia trachomatis* em mulheres brasileiras relatadas nas literaturas científicas.

1. IFD = imunofluorescência direta; 2. Estudo multicêntrico: Manaus, Recife, Belo Horizonte, São Paulo e Porto Alegre; 3. PSF = Programa da Saúde da Família; 4. LCR = Reação em Cadeia da Ligase; 5. PCR = Reação em Cadeia da Polimerase.

FONTE: ALFAIA, 2005; PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005; SANTOS, 2003.

Estimativas da Coordenação Nacional de DST / AIDS demonstram a existência de 1.967,200 casos novos de clamídia a cada ano no Brasil. Nesses, a incidência em mulheres e homens sexualmente ativos é de 3,5% (1.508,500 casos novos / ano) e 2,32%

(478.700 casos novos / ano), respectivamente (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005; PN-DST /AIDS, 2003).

Segundo Passos; Varella e Miranda (2005), para a maioria dos autores a baixa idade é considerada como um dos fatores de risco mais importantes nas pesquisas realizadas. Portanto, idade inferior a 25 anos, dependendo da população estudada, é considerada o principal fator de risco.

Todos os trabalhos citados na Tabela 1 demonstram dados de taxas de prevalência da infecção pela *C. trachomatis* em mulheres brasileiras utilizando métodos diferentes de diagnóstico. Por exemplo, no trabalho de Araújo et al. (2002), foi realizado um estudo utilizando o método de diagnóstico da PCR na cidade de Goiânia onde foi encontrada a taxa de 19,6% para clamídia no canal cervical de mulheres atendidas num ambulatório de ginecologia.

Em Manaus / Amazonas, estudiosos encontraram 27,1% dos exames positivos para *C. trachomatis*, usando a técnica de imunofluorescência direta e anticorpos monoclonais em esfregaços endocervicais, confirmando-se então a alta prevalência da infecção por clamídia em mulheres sexualmente ativas (ALENCAR; FERREIRA; LOUREIRO, 1993).

Observou-se uma positividade de 20,6% usando a técnica por PCR em esfregaços endocervicais em mulheres sexualmente ativas na cidade de Manaus / Amazonas (SANTOS et al., 2003).

Através de estudos recentes realizados por Alfaia (2005), encontrou-se resultado de 11,0% de gestantes atendidas na clínica de baixo risco infectados por clamídia em Manaus / Amazonas usando-se também a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

Vários estudos internacionais, entretanto, procuram determinar qual a população de pessoas mais infectadas por *C. trachomatis*. Assim, atualmente as doenças causadas pela clamídia atinge as seguintes pessoas (Quadro 1): (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005).

- Indivíduos com outras DST
- Parceiros sexuais de indivíduos com gonorréia
- Indivíduos jovens
- Recém-nascidos de mães infectadas

Quadro 1– Grupos de indivíduos com alto risco de DST por clamídia.

FONTE: PASSOS, VARELLA e MIRANDA, 2005.

Pelo que já foi mencionado, mesmo em países desenvolvidos, como EUA, as infecções por *C. trachomatis* ainda são inadequadamente controladas pelos serviços de saúde, apesar da ênfase na prevenção. Conscientes da real situação, o CDC e a Associação Americana de Saúde Social, no ano passado passaram a indicar rastreamento de rotina para todas as mulheres sexualmente ativas (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005).

No Brasil, nos serviços públicos, são raros os locais que oferecem a pesquisa desse patógeno. Nos serviços privados, geralmente só se pesquisa clamídia em casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais relata a presença da infecção. Mesmo nessas situações, infelizmente, a pesquisa de *C. trachomatis* ainda não faz parte da rotina da maioria dos profissionais de saúde que atendem DST (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005).

Seria importante um esforço maior envolvendo todos os seguimentos, no sentido de promover a pesquisa nos indivíduos potencialmente mais acometidos e, sobretudo em mulheres jovens sexualmente ativas com idade entre 15 e 25 anos. Isso se deve porque as complicações e seqüelas causadas pela clamídia podem atingir grandes proporções orgânicas, sociais, emocionais e econômicas para a pessoa portadora (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005).

Portanto, o diagnóstico laboratorial é vital no enfrentamento dos danos causados pela clamídia.

2.3.2. Biologia e o ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia trachomatis*

Os membros da família Chlamydiaceae, assim como os vírus, são parasitas intracelulares obrigatórios, o que significa que não podem crescer em meio artificial livre de células. As principais características desta bactéria são:

- Bacilos gram-negativos pequenos, desprovidos da camada de peptidoglicano na parede celular (DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2005; MIRANDA; GADELHA e PASSOS, 2003; MURRAY et al., 2004);
- Parasitas intracelulares estritos de seres humanos (MIRANDA; GADELHA; PASSOS, 2003; MURRAY et al., 2004); Segundo Miranda; Gadelha e Passos (2003), em função do parasitismo obrigatório, as clamídias foram consideradas por muito tempo como vírus;

- Diferem dos vírus, pois possuem um DNA e um RNA, ribossoma que evidencia uma atividade de síntese de proteínas (MIRANDA; GADELHA e PASSOS, 2003);
- Possuem sensibilidade a certos antibióticos (MIRANDA; GADELHA e PASSOS, 2003);
- São desprovidas de motilidade e se classificam nas espécies *trachomatis*, *pneumoniae* e *psitacci*. As espécies *trachomatis* e *pneumoniae* são reconhecidas como patógenos humanos, enquanto a *psitacci* é reconhecida como patógeno animal. A *C. psitacci* infecta primeiramente as aves, bovinos e ovinos e pode desencadear em humanos uma doença respiratória por exposição ao material infeccioso (geralmente fezes de aves infectadas) (DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2005);
- Possuem sete a dez cópias de DNA plasmidial por célula bacteriana, enquanto que para o genoma codificador de maior proteína externa da *C. trachomatis* (MOMP) é detectado apenas uma cópia de DNA (PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999).

A *C. trachomatis* pertence à família Chlamydiaceae e é responsável pela etiologia de patologias diferentes, associadas as biovariedades como tracoma, linfogranuloma venéreo e infecções genitais (MOLANO et al., 2004). O tracoma é uma infecção ocular do tipo cerato-conjuntivite crônica causada pelas sorovariantes A, B, Ba e C. Inicialmente, os pacientes apresentam conjuntivite folicular que envolve toda a conjuntiva. Com a evolução da doença, a conjuntiva sofre fibrose e as pálpebras e os cílios do paciente se dobram para dentro causando escoriação da córnea, ulceração, fibrose e formação de *pannus* na córnea que pode progredir à cegueira (FRIAS et al. 2001; MURRAY et al., 2004).

A bactéria possui um ciclo de desenvolvimento bifásico e replicação dentro de vacúolos na célula hospedeira, formando inclusões citoplasmáticas características (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; MURRAY et al., 2004). O ciclo de desenvolvimento da clamídia ocorre dentro da célula hospedeira, garantindo com isso um meio ambiente livre da competição com outros microrganismos e preservação da ação do sistema imune (SILVA e LONGATTO, 2000). A replicação apresenta um ciclo multimórfico e sem sincronismo de desenvolvimento. Dentro deste ciclo multimórfico ocorrem duas formas bem distintas: os corpos elementares (CE) e os corpos reticulares (CR) (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; HALL, 1997; SCHACHTER e STAMM, 1999). O corpo elementar é um pequeno coco eletro – denso de 300nm a 400nm de diâmetro com numerosos ribossomos circundados por uma rígida parede trilaminar. É uma forma infecciosa, metabolicamente inativa, que não se divide e é capaz de sobreviver na região

extracelular (GREGORY; GARDNER; BYRNE, 1979; MURRAY et al., 2004). Esta partícula, que é considerada infecciosa e metabolicamente inativa, penetra no organismo através de solução de continuidade na pele ou mucosas. Logo a seguir, essa partícula adere a célula do hospedeiro suscetível, que parece envolver uma interação específica entre receptores de membrana (Figura 3).

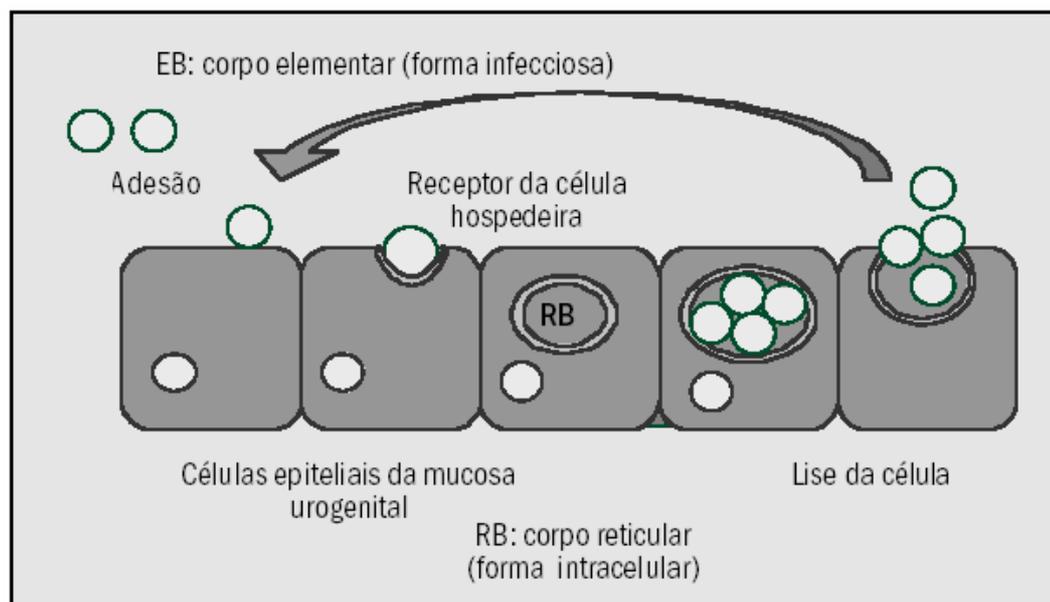


Figura 3 – Ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: SCHACHTER e STAMM, 1999.

Uma vez aderida à célula hospedeira, através das microvilosidades, a clamídia penetra na célula hospedeira por um mecanismo de endocitose e é rapidamente internalizada pelo macrófago inibindo a fusão fagolisossômica. Então, o corpo elementar dá origem a uma forma metabolicamente ativa, o corpo reticulado. Essas partículas reticuladas utilizam os substratos do hospedeiro para se dividir. Aproximadamente 40 a 48 horas após a penetração, o macrófago é rompido, liberando os corpos elementares infectando células vizinhas (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005; PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005; SCHACHTER e STAMM, 1999). Segundo Warford et al. (1999), aproximadamente oito horas após a entrada na célula, começa a replicação por divisão binária, completando-se o ciclo dentro do endossoma. Por ser linfotrópica, os corpos elementares invadem os vasos linfáticos e de acordo com Scroferneker e Pohlmann (1998), de 4 a 21 dias após o contágio sexual forma-se no ponto de penetração uma reação inflamatória, seguida de aparecimento de linfadenopatia inguinal. Inicialmente, no local da infecção ocorre uma

resposta imune de leucócitos polimorfonucleares (PMN) seguida por infiltração de tecido com linfócitos, macrófagos e eosinófilos. (ORTIZ et al., 1996).

Geralmente, as infecções por *C. trachomatis* ocorrem nas superfícies epiteliais e mucosas. As células mais suscetíveis são as colunares endocervicais ou metaplásicas escamosas e parabasais do trato genital inferior (SILVA e LONGATTO, 2000). Murray et al. (2004), descreveram que os receptores para corpo elementar são restritos principalmente às células epiteliais não-ciliadas, colunares, cúbicas ou de transição, que são encontradas nas membranas mucosas da uretra, endocérvix, endométrio, trompas uterinas, ovários, reto e conjuntivas.

Segundo Mandal; Douglas; Ben (1990), o corpo elementar tem uma aglutinina na sua superfície e possui igual conteúdo de DNA e RNA. Já o corpo reticular é maior do que o corpo elementar medindo-se em torno de 1000nm e segundo Warford et al. (1999), o CR é mais rico em RNA e possui uma parede celular não rígida.

Apesar de serem antigenicamente complexas, os antígenos lipopolissacarídico (LPS) e a proteína de membrana externa principal (*major outer membrane protein*) (MOMP) estão mais relacionados ao diagnóstico e à patogênese da infecção por clamídia. A proteína de membrana externa principal (MOMP) é porosa e possui na sua extensão pontes de dissulfeto, as quais estão presentes tanto no corpo elementar quanto no corpo reticular (WARFORD et al., 1999).

O corpo reticular (CR), não infectante, encontrado apenas ao nível intracelular, divide-se intracelularmente por divisão binária, é metabolicamente ativo e responsável pela formação da infecção clamidial (GREGORY; GARDNER e BYRNE, 1979; PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005; STEPHENS et al., 1998). O corpo reticular é uma forma replicativa que se divide e ocupa dentro do endossoma tornando-se numa inclusão citoplasmática com progênie e glicogênio. Quando a célula hospedeira é infectada com mais de um corpo elementar de *C. trachomatis*, os endossomos fundem-se de tal maneira que cada célula possui apenas uma inclusão citoplasmática. A produção de novas unidades infecciosas por célula hospedeira alcança aproximadamente 100 a 1000 corpos elementares, representando aproximadamente 8 a 12 novas duplicações de um único microrganismo (De la MAZA e PETERSON, 1982; WARFORD et al., 1999).

A *C. trachomatis* possui uma característica interessante ao se referir ao seu ciclo vital. Depende de proteínas específicas e da capacidade da célula hospedeira em gerar energia e outros intermediários metabólicos, portanto, depende do estado

nutricional da célula hospedeira para sua multiplicação (MOULDER, 1984; SCROFERNEKER e POHLMANN, 1998).

As clamídias possuem um sistema de fazer intercâmbio de uma molécula própria de ADP por uma molécula de ATP da célula hospedeira. Portanto, não são capazes de produzir seu próprio ATP, composto essencial para o metabolismo e respiração. Essas bactérias realizam o processo de transcrição com RNA polimerase própria, mas para isso, é necessária a utilização dos nucleosídeos trifosfatos da célula hospedeira, assim como a de alguns aminoácidos que elas não são capazes de produzir. O RNAm é produzido a partir do DNA cromossômico usando a RNA polimerase do corpo elementar. Tanto o RNAt quanto o RNA ribossomal também estão presentes no corpo elementar (ALLAN e PEARCE, 1983; MOULDER, 1984; SILVA e LONGATTO, 2000).

Em cultura de tecidos, a duração do ciclo de vida está entre 48 a 72 horas, sendo que alguns sorotipos apresentam um crescimento mais rápido do que outros. Com bastante frequência, o sorotipo de linfogranuloma venéreo (LGV), completa o seu ciclo de vida de uma forma mais rápida que o do tracoma. No final do ciclo de vida, quando a inclusão contém apenas corpos elementares do linfogranuloma venéreo (LGV), ocorre o rompimento da célula, acarretando lise celular com liberação dos corpos elementares, os quais infectam novas células hospedeiras (De la MAZA e PETERSON, 1982).

2.3.3. Imunobiologia

O esclarecimento da imunobiologia da infecção por *C. trachomatis* é essencial para o desenvolvimento de uma vacina. A vacina precisa induzir a resposta imunológica que está associada à infecção ou a imunopatologia (BRUNHAM e REY-LADINO, 2005).

O mecanismo da imunidade contra a clamídia ainda não se encontra totalmente esclarecido, mas sabe-se que infecções prévias não são capazes de conferir uma resistência eficaz às reinfecções. A clamídia possui habilidade de escapar dos mecanismos imunológicos do hospedeiro. (MIRANDA; GADELHA; PASSOS, 2003; SCROFERNEKER e POHLMANN, 1998).

Segundo Jones (1995); Murray et al. (2004), foi descrito que a infecção natural por *C. trachomatis* confere baixa proteção contra a reinfecção e, por sua vez, é

considerada de curta duração. A reinfecção induz uma intensa resposta inflamatória com conseqüentemente formação de lesão tissular. Com isso, essa resposta inflamatória pode induzir a formação de fibrose que leva a infertilidade e disfunção sexual em pacientes com infecções genitais. Alguns estudos demonstraram as razões das infecções recorrentes serem elevadas em indivíduos sexualmente ativos com infecção do trato genital: 29% em homens e mulheres que por um período de três anos e meio foram atendidas na clínica de doenças sexualmente transmissíveis e 38,4% em mulheres adolescentes que foram seguidas durante um período de dois anos. Entretanto, já foi sugerido por alguns pesquisadores, que a infecção do trato genital feminino confere, no mínimo, uma imunidade parcial contra a manifestação da reinfecção.

Segundo Debattista et al. (2003), na história natural da infecção clamidial, há uma forte ligação do desenvolvimento do ciclo intracelular da clamídia com a resposta imune, como a presença de Interferon- γ (IFN- γ). A resposta imune do hospedeiro para a infecção clamidial pode resultar tanto em proteção ou em resposta patológica. De acordo com Paavonen (2004), o dano tecidual é resultado do reconhecimento imune de antígenos específicos expressos pelo o organismo. Porém, a infecção crônica do trato genital superior poderá ser também resultado de falhas ou enfraquecimento da ação das células T *helper*-1 (*Th*-1) e/ou resposta hiperestimulada das células *Th*-1. A regulação da produção de citocinas (proteínas sinalizadoras) é essencial para o sucesso na resposta imune quando relacionados à infecção por patógenos intracelulares. Deficiências na produção ou na atividade das citocinas podem estar associadas com processo inflamatório no hospedeiro, apresentando assim, falhas no sistema imunológico.

Kinnunen; Paavonen e Surcel (2001) descreveram que o principal componente clamidial, a proteína de choque térmico 60, ou seja, *chlamydial heat shock protein 60* (*CHSP60*), está associada com seqüelas de longa duração nas tubas uterinas. Esse fato indica o aumento da prevalência dos anticorpos *CHSP60* em mulheres com infecção severa para o antígeno *CHSP60*. A presença da *CHSP60* na membrana externa do corpo elementar ocorre durante o processo de modificação intracelular do corpo reticular para corpo elementar. Assim, as repetidas exposições às infecções por clamídia ou exposição para outra bactéria homóloga a *HSPs*, poderá resultar numa resposta prolongada de anticorpo na inflamação crônica. Indivíduos com predisposição genética apresentando resposta imune deficiente poderão desencadear um ciclo persistente de infecção associada com uma

contínua estimulação antigênica na inflamação crônica, podendo resultar em cicatrização nas tubas uterinas.

Segundo López-Hurtado e Guerra-Infante (2002), vários estudos já demonstraram uma alta proporção de mulheres com doença inflamatória pélvica apresentando anticorpos contra a proteína de choque térmico 60. Relataram a presença desses anticorpos em mulheres apresentando infertilidade por fator tubário e gravidez ectópica. Portanto, foi demonstrado que esta proteína participa no processo inflamatório e no desenvolvimento da auto-imunidade manifestando, possivelmente, progressão para obstrução tubária ou formação de aderências.

De acordo com López-Hurtado e Guerra-Infante (2002), a infecção por clamídia, tanto em animais e em humanos, induz respostas de anticorpos específicos. Por exemplo, há evidências que a infecção cervical em mulheres induz resposta de anticorpos IgM e IgG e que o título de anticorpos de IgM séricos, se encontra altamente associado com o número de microrganismos encontrados na cérvice.

Cotter et al., (1995), verificaram que a presença de imunoglobulina A (IgA) e imunoglobulina G (IgG) produzidas por anticorpos monoclonais (Mabs) específicos para a proteína de membrana externa (MOMP) principal da *C. trachomatis*, possui efeito na prevenção da colonização clamidial, protegendo assim o trato genital. Porém, o efeito é mais pronunciado na infecção clamidial ascendente e acompanhamento da patologia do trato genital superior.

Os linfócitos também têm um papel fundamental na resistência à infecção, tanto com respostas humorais, quanto mediadas por células T – citotóxicas. As clamídias são estimuladoras policlonais de linfócitos B, com aumento dos níveis de IgM durante a infecção. Os anticorpos são capazes de neutralizar esse microrganismo, inibir sua adesão à superfície celular e impedir a mudança de corpo elementar para partículas reticuladas no fagossomo (SCROFERNEKER e POHLMANN, 1998). Porém, Cotter et al. (1995); Ramsey; Soderberg; Rank (1988) descreveram em seus estudos a deficiência de células B diante da infecção clamidial em ratos, demonstrando que o anticorpo não é requerido para a resolução da infecção do trato genital ou para resistência a reinfeção do trato genital. Portanto, esse fato não indica que o anticorpo não seja um componente importante para a proteção do animal imunocompetente, mas serve como parâmetro de que o anticorpo, por si só, não é suficientemente capaz de prevenir a infecção.

2.3.4. Processo Infeccioso da *Chlamydia trachomatis*

A *C. trachomatis* é obrigatoriamente uma bactéria intracelular que causa várias doenças de transmissão sexual (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005; SCHACHTER, 1999).

A *C. trachomatis* possui 18 sorotipos diferentes já identificados (Tabela 2). Os sorotipos L1, L2 e L3 são responsáveis pela síndrome do linfogranuloma venéreo; os A, B, Ba e C são mais freqüentemente associados ao tracoma, e os de D a K (D, E, F, G, H, I, J, K) estão ligados a outras manifestações sexualmente transmissíveis, sendo que os sorotipos D, E e F são mais freqüentes (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005; RHOTON-VLASAK, 2000; SCHACHTER, 1999).

Sorotipos	Doenças humanas	Formas de disseminação	Patologia
A, B, Ba e C	Tracoma ocular, Tracoma endêmico.	Mãos aos olhos, fomites, moscas	Conjuntivite
D, Da e E, F, G, H, I, Ia, J, Ja e K	Doença óculo genital, Uretrite, Oftalmia, Cervicite, Bartholinite, Endometrite, Salpingite (DIP), Peri-hepatite, Pneumonia, Síndrome de Reiter e Câncer de colo uterino?	Sexual e perinatal	Cervicites, Uretrites, Endometrites, Doença Inflamatória Pélvica, Infertilidade, Gravidez Ectópica, Conjuntivite Neonatal e Pneumonia Infantil.
L1, L2 e L3	Linfogranuloma Venéreo	Sexual	Invasão da Submucosa linfo-nodular, com granulomas necrosantes e Fibroses

Tabela 2 – Sorotipos da *Chlamydia trachomatis* e sua associação com doenças humanas.

FONTE: PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2005; RHOTON-VLASAK, 2000; SCHACHTER, 1999.

Normalmente, a *C. trachomatis* infecta a camada de células colunares do epitélio na endocérvice da mulher (Figura 4) e da uretra do homem. Dentro das células epiteliais, a clamídia passa por um único desenvolvimento de ciclo que produz formas infectantes (conhecidos como corpos elementares), que infectam células epiteliais vizinhas

(Figura 5). No local da infecção na mucosa, pode ocorrer uma intensa inflamação que é caracterizada pela vermelhidão e edema, resultando numa cervicite mucopurulenta em mulheres e uretrites não gonocócicas em homens (PEIPERT, 2003). As manifestações clínicas das infecções por clamídias são devidas a destruição celular durante a multiplicação e resposta inflamatória do hospedeiro (MURRAY et al., 2004). Entretanto, apesar da localização inicial da inflamação, a infecção pela *C. trachomatis* permanece na forma subclínica em alta proporção em pessoas infectadas (70% - 90% em mulheres e 30% - 50% em homens) (PEIPERT, 2003). Em geral, as mulheres infectadas e assintomáticas podem demonstrar sinais da doença como a endocervicite mucopurulenta e hipertrofia cervical com ectopia (BARACAT e LIMA, 2005). Incluem também sintomas clínicos como a disúria, fluxo menstrual anormal, sangramento pós – coito e dor na região inferior do abdômen (PEIPERT, 2003). Em algumas mulheres não tratadas (20% - 40%), as infecções ascendem do epitélio endometrial para as tubas uterinas, onde a *C. trachomatis* pode estabelecer uma infecção persistente e ocasionar uma DIP. No total, 11% das mulheres com DIP desenvolvem infertilidade nas tubas uterinas e cerca de 9% desenvolvem gravidez ectópica (COHEN e BRUNHAM, 1999). Segundo Fernandes et al. (2004) a disseminação das infecções genitais, principalmente por clamídia, tem elevado o número de mulheres com seqüela tubária, o que também contribui para o aumento das gestações ectópicas. Segundo Soares et al. (2005) a incidência de seqüelas nas tubas eleva-se após os sucessivos episódios de inflamação pélvica: 13% após o 1º episódio, 35% após o 2º episódio e 75% após o 3º episódio.

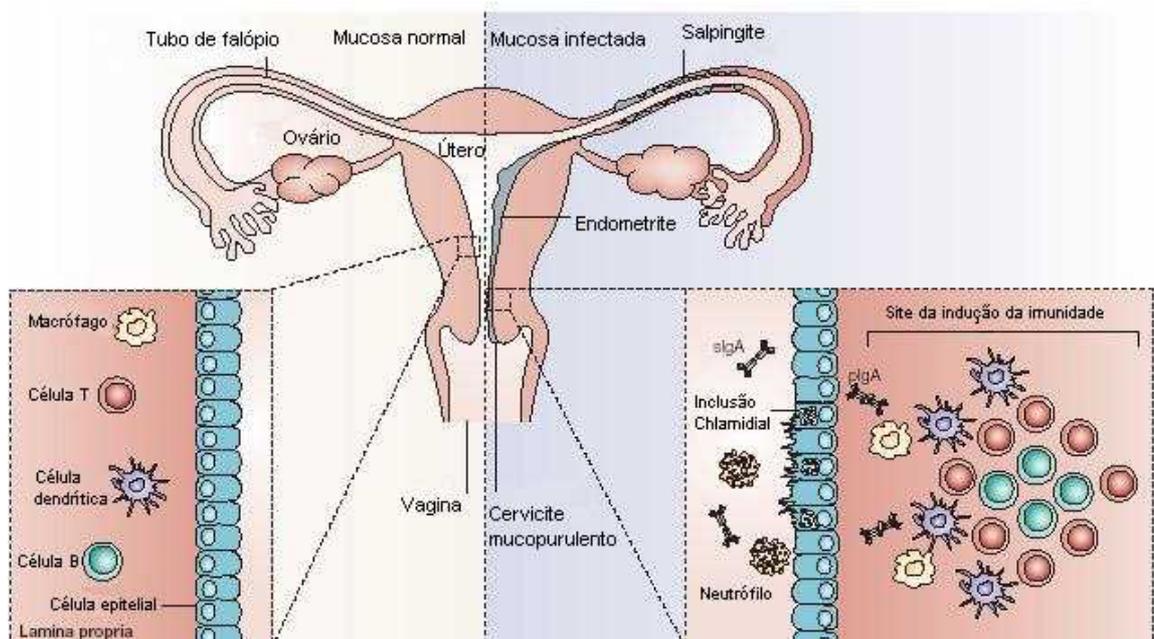


Figura 4 – Infecção do trato genital feminino pela *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: BRUNHAM e REY-LADINO, 2005.

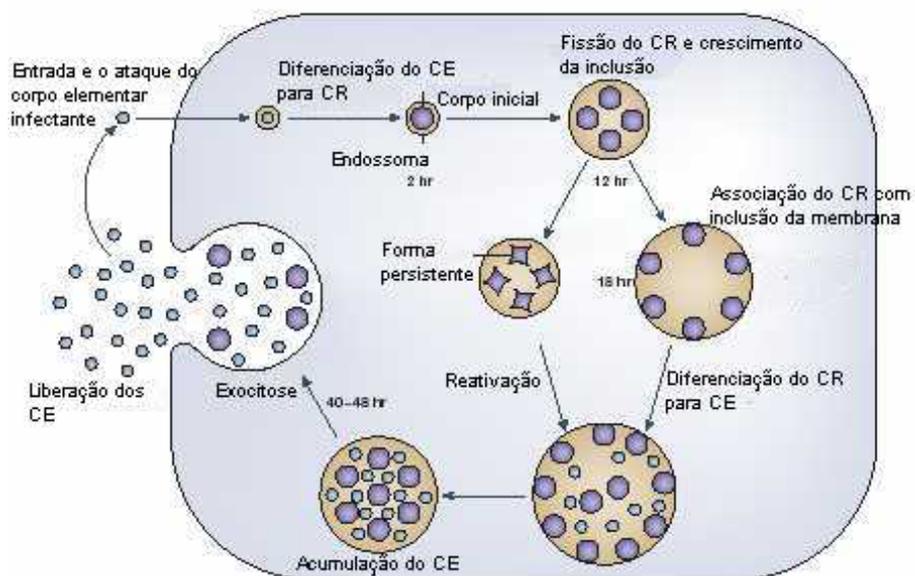


Figura 5 – Desenvolvimento do Ciclo da *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: BRUNHAM e REY-LADINO, 2005.

A gravidez ectópica (Figura 6) é resultado da implantação embrionária fora do útero. Estudos indicam que múltiplos fatores contribuem para esse risco, e sabe-se que qualquer fator que impeça a migração do embrião para a cavidade uterina levaria a mulher à gravidez ectópica. A infecção prévia seria o fator mais importante e pacientes que apresentam história clínica de salpingite, apresentam probabilidade de 1.000 vezes maior de ter uma gestação tubária do que a população em geral (SOARES et al., 2005).

Portanto, este risco parece ser maior para aquelas com DIP causada pela infecção com *C. trachomatis* em comparação com a DIP causada por outros fatores, como infecções por *N. gonorrhoeae* (BRUNHAM et al., 1988). Apesar da mortalidade ter diminuído ao longo da última década, através do diagnóstico precoce, a gravidez ectópica tem sido responsabilizada por 9% das mortes por hemorragia interna grave no primeiro trimestre da gestação nos Estados Unidos. A gravidez ectópica é considerada uma das complicações possíveis após infecção de trato reprodutivo. A ascensão do processo infeccioso do cérvix ao aparelho reprodutor superior, poderá causar salpingite, hidrossalpinge e abscesso ovariano. O conseqüente dano parcial ou completo das tubas uterinas poderá culminar com seqüelas que poderão induzir gravidez ectópica, esterilidade definitiva e ou dor pélvica crônica (FERNANDES et al., 2004; MIRANDA; GADELHA e PASSOS, 2003; WHO, 2005). Segundo Kamwendo et al. (2000), a redução da incidência de DIP está associada a declínio na incidência de gestação ectópica. Essa diminuição é maior em mulheres com idade menor que 25 anos. Então, a prevenção da DIP não somente diminui a incidência de gestação ectópica como também reduz seus efeitos adversos sobre a permeabilidade tubária.



Figura 6 – Gravidez ectópica.

FONTE: Retirado de <<http://www.ultrasom3d.com>>. Acesso em: 20 novembro 2005.

2.3.5. Manifestações clínicas das principais doenças causadas pela *Chlamydia trachomatis*

Segundo Diagnósticos da América (2005), a *C. trachomatis* pode acometer vários locais do organismo, causando, assim, manifestações clínicas bem diferentes. Dentre estes acometimentos, destacamos:

- Uretrite / síndrome uretral aguda;
- Cervicite;
- Proctite;
- Bartholinite;
- Infecção do trato genital superior feminino;
- Endometrite;
- Salpingite;
- Oftalmia;
- Peri-hepatite (*Síndrome de Fitz-Hugh-Curtis*);
- Infecções perinatais;
- Linfogranuloma venéreo;
- Síndrome de Reiter;
- Câncer cervical.

A infecção uretral é comum nas mulheres. Casos de piúrias sintomáticas ou assintomáticas sem causa aparente ou de cistites com cultura negativa são altamente sugestivos de uretrite por *C. trachomatis* (DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2005).

O epitélio endocervical é o tecido que é mais frequentemente infectado, e a maioria dos casos é assintomática. Além de causar uretrites, cervicites, endometrites e doença inflamatória pélvica nas mulheres, a infecção pode evoluir com complicações. As mais frequentes são a infertilidade (fibrose das trompas de Falópio), a gestação ectópica e, menos frequentemente, a chamada síndrome de *Fitz-Hugh-Curtis* (peri-hepatite). Estudos realizados entre essas pacientes com quadros de infertilidade por lesões tubárias e gravidez ectópica demonstraram positividade três vezes maior para os anticorpos contra *C.*

trachomatis do que na população normal (DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2005).

2.3.5.1. Cervicite

Cervicite mucopurulenta ou endocervicite é a inflamação da mucosa endocervical, ou seja, é a inflamação do epitélio colunar do colo uterino. Vários estudos demonstraram que a etiologia das cervicites está relacionada com *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; WHO, 2005).

Segundo Ministério da Saúde (2006), embora a infecção por *C. trachomatis* seja, em maioria dos casos assintomática, a mulher com esta infecção poderá desenvolver várias complicações, se não for tratada a tempo. Uma cervicite crônica, sem ter recebido o tratamento adequado, pode-se estender ao endométrio e às trompas, causando DIP, sendo a esterilidade, a gravidez ectópica e a dor pélvica crônica consideradas as principais seqüelas.

Achados sugestivos de infecção por clamídia incluem friabilidade, secreção mucopurulenta, edema e área de ectopia. Ectopia cervical por si só não é considerada um achado anormal. Todavia, mucosa cervical muito congesta que sangra com facilidade ao tocar com a espátula ou escova endocervical na coleta de material endocervical, deve receber uma atenção redobrada (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

Muco cervical turvo ou purulento em mulheres jovens sexualmente ativas pode ter outras causas sendo de origem infecciosas ou não (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005). Vários estudos demonstraram que não há associação de sintomas específicos com infecção do canal cervical pela *C. trachomatis*. Os sintomas de cervicite e uretrite associados com infecção confirmada do colo uterino são considerados inespecíficos e podem acompanhar disúria, corrimento vaginal e prurido vaginal (MIRANDA, 2003).

Infelizmente, a maioria das mulheres com infecção por clamídia não são distinguidas das mulheres não infectadas através de um simples exame clínico. Entretanto, qualquer achado clínico e dados da anamnese devem ser valorizados como, por exemplo, investigar se o parceiro teve infecção uretral recentemente, merecem especial atenção. Se a resposta for positiva, a parceira sexual tem altas probabilidades de estar infectada por *C. trachomatis* (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

2.3.5.2. Proctite

Mulheres ou homens que praticam coito anal desprotegido com parceiros portadores de clamídia na uretra podem desenvolver infecção na mucosa retal (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

A sintomatologia da paciente com proctite pode ser nenhuma, leve ou intensa. É comum quando existe infecção retal as pacientes apresentarem dor, hiperemia e secreção purulenta na região afetada (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

Para Passos; Varella e Bravo (2005), casos mais graves de proctite dependem muito do grau da virulência da bactéria e da resposta imune do hospedeiro. Quando esses casos evoluem para proctocolite tornam-se numa situação com maiores complicações.

2.3.5.3. Bartholinite

Segundo Passos; Varella e Bravo (2005), o papel da *C. trachomatis* em casos de bartholinites não é totalmente esclarecido. Foi demonstrado num estudo que a secreção do ducto da glândula em 30 pacientes com bartholinite continha clamídia em 30% dos casos.

Não se sabe ao certo em relação à frequência de clamídia em pacientes com bartholinite. Portanto, a investigação nesses casos deve fazer parte da rotina médica (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

2.3.5.4. Infecção do trato genital superior feminino

A Sociedade Internacional de Doenças Infecciosas em Ginecologia e Obstetrícia, para redefinir o termo “doença inflamatória pélvica – DIP”, tem recomendado revisões das diretrizes dos Centros de Controle de Doenças e Prevenção – CDC, dos Estados Unidos da América, sobre as formas mais eficazes de tratamento para esta doença (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

A DIP é uma síndrome clínica que compreende um espectro de desordens inflamatórias do trato genital superior (acima do orifício interno do colo uterino),

incluindo qualquer combinação de endometrite, salpingite, ooforite, abscesso tubovariano e pelviperitonite (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

Sabe-se que o gonococo e a clamídia são considerados como os patógenos primários, pois representam a primeira onda de invasão microbiológica das tubas uterinas. As lesões provocadas por essas bactérias diminuem o potencial de defesa tubário, permitindo a invasão de outros agentes, considerados como os patógenos secundários. O gonococo pode estar associado a outros microrganismos, mas é capaz, por si só, causar uma lesão primária e formar abscessos. Já a clamídia provoca lesões com tendência a cronicidade, evocando-se mecanismos imunológicos para sua própria manutenção. Por esta razão, é possível a presença de infecções assintomáticas por esta bactéria. Portanto, nesta situação, o quadro clínico agudo e / ou a formação de abscessos dependeriam de invasão secundária de outros patógenos. Na maioria dos casos de salpingite consegue-se isolar mais de uma espécie bacteriana, confirmando-se então um ambiente polimicrobiano, sendo 90% originárias de agentes sexualmente transmissíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

2.3.5.5. Endometrite

Segundo Haggerty et al. (2003), a endometrite freqüentemente acompanha a salpingite. Entre as mulheres que apresentam salpingite, aproximadamente 70% a 90% delas apresentam a endometrite, entretanto, 8% a 33% de mulheres que não apresentam salpingite têm endometrite.

Marques e Menezes (2005) relataram, através de estudos, que a infecção por clamídia durante a gestação pode associar a vários resultados diferentes, incluindo trabalho de parto prematuro, amniorrexe prematura, baixo peso ao nascer, óbito neonatal e endometrite pós-parto. Portanto, mulheres portadoras de infecções por *C. trachomatis* durante o parto normal apresentam um risco cinco ou seis vezes maior de desenvolver febre ou endometrite pós-parto em 48 horas ou até um mês após o parto (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

Os sinais e sintomas de endometrite são os mesmos de salpingite aguda, nos quais serão mencionados logo a seguir (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

2.3.5.6. Salpingite

A salpingite por *C. trachomatis* está associada à infertilidade por fator tubário e gravidez ectópica, geralmente provocadas pelas seqüelas causadas às trompas após DIP (BARLOW et al., 2001).

De acordo com Marques e Menezes (2005); Passos; Varella e Bravo (2005), salpingite aguda, geralmente é causada por bactérias sexualmente transmissíveis oriundos primariamente do trato genital inferior feminino. Provavelmente isso seja uma das complicações mais severas e freqüentes de ocorrer. De modo geral, as bactérias tendem ascender do canal cervical ou fundo vaginal e podem acometer o endométrio e as tubas uterinas. Os principais agentes que ocasionam salpingite são clamídia e gonococo. O quadro clínico dessas infecções, principalmente quando causadas pela *C. trachomatis*, no trato genital feminino superior é considerado inespecífico, mas pode ser grave apresentando-se febre, dor pélvica, dispareunia, prostação e dor uterina durante o toque vaginal. Diante desta sintomatologia, a intensidade pode ser de forma leve, moderada ou severa. Todavia, muitos casos passam de forma insidiosa, em que a paciente percebe o desconforto, mas o tolera com razoável capacidade de resistência.

Nem sempre a sintomatologia acompanha a agressão tecidual. Tal agravo pode ocorrer desde hiperemia e secreção piogênica tubária até abscesso tuboovariano íntegro ou roto. Com certa freqüência, jovens mulheres não sobrevivem à agressão de uma peritonite difusa que pode evoluir para sépsis, principalmente quando o diagnóstico e o tratamento são feitos tardiamente. Existem outros problemas também associados a salpingite, como abortamento de forma espontânea e infecção por HIV ou por alguma outra doença crônica debilitante (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

2.3.5.7. Peri-hepatite (Síndrome de *Fitz-Hugh-Curtis*)

A *C. trachomatis* se apresenta como agente causador de peri-hepatite ou Síndrome de *Fitz-Hugh-Curtis* que o processo inflamatório agudo peri-hepático, tendo como disseminador a via linfática ou hematogênica (MICHELON et al., 2005).

Inicialmente, a ocorrência de peri-hepatite com ou após salpingite era considerada uma complicação de infecção gonocócica. Entretanto, estudos posteriores demonstraram que a periepatite associada à infecção por clamídia pode ser mais comum do que a gonocócica. Esta patologia deve ser suspeitada em quadros de dor em hipocôndrio direito, acompanhada de náuseas ou vômitos, febre com ausência de cálculos biliares e icterícia. Sinais de peritonite generalizada podem também estar presentes. Evidências de salpingite podem ou não existir, uma vez que o quadro de peri-hepatite nem sempre expressa uma disseminação imediata da infecção pélvica (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

2.3.5.8. Linfogranuloma venéreo

Também conhecido como linfogranuloma inguinal ou doença de Nicolas – Favre – Durand, é uma doença infecciosa de transmissão exclusivamente sexual, caracterizada pela presença de bubão inguinal, com período de incubação entre 3 a 30 dias. No Brasil, esta doença tem sido mais observada nas Regiões Norte e Nordeste, embora tenha se tornado também uma preocupação internacional devido a surto da doença na Holanda, entre homossexuais de sexo masculino (CDC, 2004; NIEUWENHUIS et al., 2004; PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

O agente etiológico é a *C. trachomatis* dos sorotipos L1, L2 e L3 e tem predileção pelos vasos linfáticos e linfonodos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SATO et al., 2005). O linfogranuloma venéreo desenvolve-se em três fases: lesão de inoculação, disseminação linfática regional e formação de seqüelas. A lesão de inoculação inicia-se por formação de pápulas ou pústulas indolores, que desaparecem sem deixar seqüelas. No homem, a lesão localiza-se no sulco coronal, frênulo e prepúcio e na mulher, localiza-se na parede vaginal posterior, colo uterino, fúrcula e outras partes da genitália externa. Segue-se a disseminação linfática. No homem, a linfadenopatia inguinal desenvolve-se entre 1 a 6 semanas após a formação da lesão inicial, sendo em 70% dos casos unilateral. Na mulher, a localização da adenopatia depende do local de inoculação da lesão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O comprometimento ganglionar do linfogranuloma evolui com supuração e múltiplas fistulas. A lesão da região anal pode levar à proctite hemorrágica. O contato orogenital pode levar à glossite ulcerada difusa, com presença de linfadenopatia. Os

sintomas que geralmente acompanham são: febre, mal-estar, anorexia, emagrecimento, artralgia e sudorese noturna (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Nos genitais, essas lesões podem evoluir para estiomene (elefantíase com fístulas, drenagem de secreção purulenta e úlceras) (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

No diagnóstico diferencial devem-se considerar, principalmente: cancro mole, sífilis, tuberculose ganglionar, paracoccidiodomicose inguinal, doença de arranhadura de gato (linforreticulose benigna) e doença de Hodgkin (PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

2.3.5.9. Síndrome de Reiter

Uma prevalência aumentada de artrite tem sido observada nas DST, principalmente as causadas pela *C. trachomatis* (SILVEIRA et al., 1993; XIMENES e SILVA, 1993).

É estimado que 50% dos casos de artrite reativa estão associados à infecção por clamídia com culturas de líquido sinovial estéreis por métodos convencionais (ESPINOZA et al., 1993; KUIEN et al., 1994; SILVEIRA et al., 1993;). A sintomatologia pode ser expressa como mono, oligo ou poliartrite apresentando características agudas ou crônicas (DINIZ; RAMOS e VAZ, 1985; ESPINOZA et al., 1993; SILVEIRA et al., 1993). Segundo Espinoza et al. (1993); Hughes e Keat (1992); Kuien et al. (1994); Sieper et al. (1992); Silveira et al. (1993), há uma ligação entre infecção por clamídia e artrite, embora os mecanismos patogênicos desta ligação ainda serem difíceis de serem demonstrados, tanto por ação direta da clamídia, como por mecanismos imunológicos.

Segundo Passos; Varella e Bravo (2005), a presença de *C. trachomatis* nos genitais foi associada, por ensaios sorológicos, a artropatia reativa da síndrome de Reiter. Esta síndrome consiste numa tríade clássica de uretrite, conjuntivite e artrite. O achado de clamídia em material aspirado de articulações comprometidas de pacientes apresentando tal artropatia, sugere que o quadro é uma complicação direta da infecção inicial dos genitais (uretrite / cervicite). A síndrome de Reiter pode apresentar ainda características dermatológicas bem marcantes, como balanite / vulvite circinada, representada por placas eritematosas e descamativas na vulva. Não raramente os portadores desta síndrome apresentam também estomatites, uveítes e diarreia.

2.3.5.10. Câncer cervical

Para Paavonen e Eggert-Kruse (1999), *C. trachomatis* parece ser um importante co-fator de HPV para carcinoma cervical.

Segundo Rhoton-Vlasak (2000); Samoff et al. (2005), vários estudos demonstraram associações com *C. trachomatis* e câncer cervical. De acordo com Samoff et al. (2005), associações *C. trachomatis* com outras DST, como *N. gonorrhoeae*, Herpes genital (HSV-2) e HPV são consideradas também como prováveis co-fatores para o desenvolvimento de lesões cancerosas. A infecção por clamídia, a nível celular, poderá aumentar a susceptibilidade de HPV ao nível de epitélio basal, devido à alteração das características de células epiteliais que são formadas.

Pesquisadores realizaram testes com 181 amostras de pacientes da Finlândia, Noruega e Suécia com carcinoma cervical invasivo através de métodos de sorologia e concluíram que pacientes positivas para *C. trachomatis* com sorotipo G mostrou-se fortemente associada com desenvolvimento de carcinoma de células escamosas do colo uterino. Analisaram também outros sorotipos de clamídia e verificaram que os sorotipos I e D estavam associados à lesão maligna. Portanto, evidenciou-se que a exposição a mais de um sorotipo aumenta o risco para o câncer cervical (ANTILA et al., 2001; PASSOS; VARELLA e BRAVO, 2005).

2.4. Diagnóstico Laboratorial

Segundo Marques e Menezes (2005); Seadi et al. (2003), há uma variedade de testes laboratoriais desenvolvidos para o diagnóstico da *C. trachomatis* como a coloração pela técnica de Giemsa, citologia pela técnica de Papanicolaou, histopatologia, cultura de células, técnicas de amplificação de DNA, técnicas que utilizam sondas de DNA e testes de imunodeteção através da imunofluorescência direta (DFA) e ensaio imunoenzimático (EIA). A cultura celular possui uma especificidade próxima a 100%, mas apresenta dificuldades de padronização e necessidade de estrutura de laboratório onerosa. Atualmente, os testes de imunodeteção são os mais utilizados, porém a técnica de amplificação de DNA é o método eleito por sua maior sensibilidade.

Independentemente do método de escolha utilizado para detectar *C. trachomatis*, a implementação de uma técnica deveria basear-se na sua maior sensibilidade e especificidade (SEADI et al., 2003). A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método considerado de alta especificidade e sensibilidade, que utiliza a amplificação do ácido nucléico da clamídia (DNA alvo), permitindo assim a sua detecção mesmo estando em pequenas concentrações (DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2005).

Segundo Marques e Menezes (2005), na prática médica, os exames mais solicitados são os seguintes:

2.4.1. Coloração pela técnica de Giemsa

A coloração pela técnica de Giemsa detecta as densas inclusões citoplasmáticas granulosas causadas pela presença de *C. trachomatis*.

2.4.2. Citologia pela técnica de Papanicolaou

Esta técnica mostra as mesmas inclusões encontradas na coloração pelo Giemsa. O exame de Papanicolaou é considerado de baixa sensibilidade e não deve ser utilizado como método de rastreio para a clamídia.

2.4.3. Histopatologia

A presença de lesões inflamatórias crônicas e fibrocísticas com granulações e formação de folículos suspeita-se de infecção por clamídia. Nos casos de linfogranuloma venéreo, encontra-se formação de abscessos e, ocasionalmente células gigantes multinucleadas. Na cervicite mucopurulenta por clamídia, são encontrados folículos linfóides no estroma cervical ao exame histopatológico.

2.4.4. Pesquisa de anticorpos

As técnicas sorológicas mais comuns, como a fixação do complemento, a imunofluorescência indireta (IFI), que utiliza células infectadas com o sorotipo L2, e o enzima-imunoensaio, que utilizam antígenos recombinantes detectam anticorpos gênero-específicos (SCHACHTAR e STAMM, 1999; SEADI et al., 2002).

As técnicas que permitem detectar separadamente anticorpos de classe IgG, IgA e IgM são mais úteis e podem ser consideradas positivas para infecção recente segundo Michelon et al. 2005, embora a pesquisa de IgM seja freqüentemente indetectável quando a infecção é recorrente (SCHACHTAR e STAMM, 1999). A presença de anticorpo IgM e/ou IgA e um aumento significativo (pelo menos dois títulos) de IgG entre uma amostra colhida na fase aguda e outra na convalescente evidenciam uma infecção recente (MICHELON et al., 2005; SEADI et al., 2002). Para Abdelmassih (2006), a pesquisa de anticorpos séricos para clamídia deve fazer parte da investigação de infertilidade. O diagnóstico sorológico em pacientes com doença severa é positivo em 50% dos casos. Anticorpos IgG plasmáticos apresentam títulos >32 UI/MI em 80% das mulheres com doença tubária e em somente 25% das pacientes inférteis com trompas normais. Para as pacientes com sorologia positiva a pesquisa de clamídia por PCR pode orientar definitivamente um provável diagnóstico de acometimento tubário severo.

Existem poucos estudos publicados a respeito dos enzima-imunoensaios heterogêneos indiretos (EIA) e imuno-eletrotransferência (SEADI et al., 2002).

O papel da clamídia como um antígeno alvo de linfócitos T tubários e endometriais derivados de pacientes com DIP e infertilidade tubária já foi determinado. A especificidade dos anticorpos de linhagens de linfócitos T originados dos tecidos mencionados contra os respectivos antígenos já foi testada contra corpúsculos elementares de clamídia e contra proteína *CHSP60*. Kinnunen et al. (2000) descreveram que as linhagens de linfócitos T contra clamídia foram estabelecidas *in vitro* a partir de tecidos do trato genital de pacientes com DIP e infertilidade tubária. A reatividade dos linfócitos T tubários à proteína *CHSP60* forneceu uma evidência de que a imunorreatividade é uma resposta predominante em pacientes que apresentam danos tubários. A proteína *CHSP60* pode ser considerada um antígeno de grande importância para linfócito T estando, portanto, envolvido na imunopatogenia do dano tubário associado com a infecção crônica por clamídia (KINNUNEN et al., 2002).

Segundo Peeling et al. (1997), a presença de anticorpos anti-*CHSP60* está associada a um risco duas a três vezes maior de desenvolver DIP.

Segundo Michelon et al. (2005), em trabalho de revisão, apesar da alta resposta imunológica às infecções por clamídia, a sorologia não é o melhor método para o seu diagnóstico, uma vez que, infecções prévias para clamídia podem deixar níveis séricos de anticorpos elevados, tornando difícil a distinção de um processo infeccioso.

Para Schachter e Stamm, (1999); Seadi et al., (2002), a sorologia é recomendada para estudos epidemiológicos e infecções sistêmicas, como pneumonia, infertilidade, gravidez ectópica, onde os títulos de anticorpo IgG são frequentemente elevados. Entretanto não é recomendada para o diagnóstico de infecções urogenitais devido à frequência de exposição aos sorotipos da *C. trachomatis* e pela ocorrência de reações cruzadas com outras espécies especialmente a *C. pneumoniae* (MICHELON et al., 2005; SEADI et al., 2002).

2.4.5. Cultura

Até alguns anos, por apresentar alta especificidade, a cultura de células McCoy era considerada o teste padrão ouro para o diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* (DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2005). Este teste possui sensibilidade de 70% a 85% e especificidade de 100% (MICHELON et al., 2005). Apesar de sua alta especificidade, a cultura apresenta algumas restrições, com o longo tempo para obtenção do resultado (48 a 72 horas após a inoculação) e o fato de detectar apenas bactérias vivas (DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2005; MICHELON et al., 2005). Portanto, o resultado pode ser prejudicado por situações inadequadas de coleta, armazenamento e / ou transporte, o que diminui sua sensibilidade em cerca de 70% a 80% (DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA, 2005). Para Abdelmassih, (2006), esse procedimento tem sensibilidade < 70% para infecção cervical e é menos sensível ainda para infecção uretral em homens e mulheres. De acordo com Puolakkainen et al. (1998), a cultura já foi considerada como padrão ouro. Entretanto, estudos de PCR e LCR sugerem que a sensibilidade da cultura, até mesmo nos melhores laboratórios, chegam a 75% a 85%.

Segundo Puolakkainen et al. (1998), a cultura já não serve mais como método de referência nos testes de avaliação para diagnóstico de *C. trachomatis*.

A agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) tem ampliado a definição de um resultado verdadeiramente positivo para a infecção por clamídia, baseando-se na combinação de dois testes (cultural e não-cultural) (SEADI et al., 2002). De acordo com o Guia da Prática Clínica, publicado pelo CDC, um diagnóstico para ser considerado definitivo quando a cultura é positiva ou um teste não-cultural é confirmado por um segundo teste não-cultural (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1991; SEADI et al., 2002). Portanto, a associação de duas técnicas não-culturais positivas é aceita como padrão-ouro expandido (SEADI et al., 2002).

2.4.6. Pesquisa de antígenos (Ag)

Os testes de detecção de antígenos baseiam-se na reação com os antígenos contidos no lipopolissacarídeo (LPS) e na proteína principal de membrana externa (MOMP) (*Major Outer Membrane Protein*) através de anticorpos mono ou policlonais marcados com enzimas (MICHELON et al., 2005; SEADI et al., 2002).

A visualização direta das estruturas antigênicas da clamídia, através de Imunofluorescência direta (DFA), pode ser utilizada utilizando-se anticorpos monoclonais fluorescentes dirigidos aos corpos elementares (CE) e corpos reticulares (CR) (SEADI et al., 2002). A desvantagem do método é a necessidade de ter um microscopista treinado e a dificuldade em se processar um grande número de amostras. A experiência na interpretação é fundamental, porque a ligação inespecífica do anticorpo a outros microrganismos pode ocorrer, levando a um resultado falso-positivo (HALL, 1997; WARFARD et al., 1999).

Segundo Black (1997); Weinstock, et al. (1994), a detecção direta de antígeno também pode ser realizada por teste de Enzima-imunoensaio (EIA). Quando o antígeno está presente, este reage com um anticorpo marcado com enzima, cujo produto final pode ser avaliado por espectrofotometria, fluorescência ou quimiluminescência e correlacionando com a positividade do teste ou não. Técnicas de EIA que empregam anticorpo anti-LPS apresentam a desvantagem de poderem resultar em reação cruzada com o LPS de outras bactérias como bactérias gram-negativas, *Acinetobacter* sp., membros da família das enterobactérias, neisserias, salmonelas e *Gardnerella vaginalis*, levando a resultados falsamente positivos (BLACK, 1997; MICHELON et al., 2005; WARFORD, et al., 1999; WEINSTOCK, et al., 1994). Portanto, deve ser utilizado o bloqueio dos

anticorpos para a obtenção de um melhor resultado, ou seja, aumentar a especificidade do teste (KELLOGG; SEIPLE; HICK, 1992; MICHELON et al., 2005).

Segundo Michelon et al. (2005), em estudo recente, compararam o teste de EIA com a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (*Polymerase Chain Reaction*) para a detecção de clamídia, observando-se um aumento de 46% na sensibilidade de identificação a favor do PCR. Em geral, a sensibilidade dos EIA é menor do que a cultura (HALLSWORTH et al., 1995; SCHACHTER e STAMM, 1999).

2.4.7. Pesquisa de Ácidos Nucléicos

A pesquisa de ácidos nucleicos é considerada o teste mais promissor para o diagnóstico das infecções por clamídia (MICHELON et al., 2005).

A partir da década de 80, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecção por clamídia, por ser mais rápida e sensível (SEADI et al., 2002). Segundo Paavonen e Eggert-Kruse (1999), os testes de amplificação de ácidos nucleicos devem ser considerados os testes de escolha para diagnóstico de infecção por *C. trachomatis*. Sua sensibilidade é em torno de 75% e a especificidade entre 95% a 99% (MICHELON et al., 2005).

Segundo Schachter e Stamm (1999), a tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos é um teste que surgiu como o mais importante avanço no diagnóstico da clamídia desde que a técnica de cultura de células (*in vitro*) substituiu a técnica de isolamento em ovos embrionados.

As técnicas de amplificação detectam com rapidez pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas e a amplificação de DNA ou RNA consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de iniciadores (*primers*) de uma sequência de DNA alvo. Os iniciadores definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica (KRITSKI et al., 1997; QUINN et al., 1996). Quando os iniciadores empregados são específicos para a clamídia, a confiabilidade no resultado do PCR aumenta significativamente (MICHELON et al., 2005). A especificidade e a sensibilidade da técnica de PCR dependem dos iniciadores utilizados (SEADI et al., 2002).

Segundo Caliendo (1998); Hallsworth et al. (1995); Michelon et al. (2005) a sensibilidade dos testes de amplificação de DNA é em torno de 20% maior do

que a da cultura de células, da imunofluorescência direta (DFA) e do ensaio imunoenzimático (EIA).

A reação da PCR dirigida ao plasmídeo da clamídia é considerada mais sensível, já que este pode conter de 7 a 10 cópias de DNA, enquanto a PCR dirigida ao genoma codificador MOMP dispõe de uma só cópia (PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999; SEADI et al., 2002).

Kellog; Baillargeon e Lukefahr (2004) compararam os testes de amplificação de DNA e as técnicas de cultura na detecção de clamídia em crianças suspeitas de abuso sexual, identificando que, enquanto 11,1% das crianças suspeitas apresentaram teste positivo para clamídia por LCR, apenas 0,8% tiveram exames culturais positivos. George et al., 2003 compararam os resultados entre PCR realizado a partir de secreção cervical e de amostra urinária e identificou a sensibilidade, especificidade, valor positivo e negativo de 100%, 98%, 96% e 100%, respectivamente, para amostra genital e 82%, 100%, 100% e 92%, respectivamente, para amostra urinária.

Os testes comerciais de amplificação de DNA aprovados pelo FDA são: a *polymerase chain reaction* (PCR), a *ligase chain reaction* (LCR) e o *transcription-mediated amplification assay* (TMA) (BLACK et al., 2000). A PCR e a LCR amplificam uma seqüência de nucleotídeos do plasmídeo, e a TMA é dirigida ao RNA ribossomal da clamídia. Técnicas mais sensíveis, como as da amplificação precisam de poucas cópias do gene para a obtenção de um resultado positivo (CALIENDO, 1998; MICHELON et al., 2005; TOYE, et al., 1998).

A seqüência do DNA da clamídia presente na amostra clínica é exposta por tratamento com detergente ou por lise do microrganismo através de aquecimento e é extraída para análise. O DNA extraído é colocado em um tubo contendo todos os reativos necessários para a reação da PCR. A reação ocorre em um termociclador, onde inicialmente a dupla hélice é desnaturada através da elevação da temperatura para 92° a 96°C, de modo que os iniciadores possam se hibridizar nas seqüências complementares. Dependendo do tamanho e seqüência do iniciador utilizado, é permitida a hibridização DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35° a 70°C. A enzima *Taq* DNA Polimerase promove a adição de bases através da extensão ou polimerização a partir de cada extremidade 3' dos iniciadores, compondo uma nova molécula de DNA, que serve de molde para outros ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Múltiplos

ciclos produzirão uma amplificação logarítmica de um segmento de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; HALLSWORTH et al., 1995).

Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo. Normalmente são empregados 30 a 50 ciclos. Esta escala de amplificação permite iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência de interesse (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998) (Figura 7).

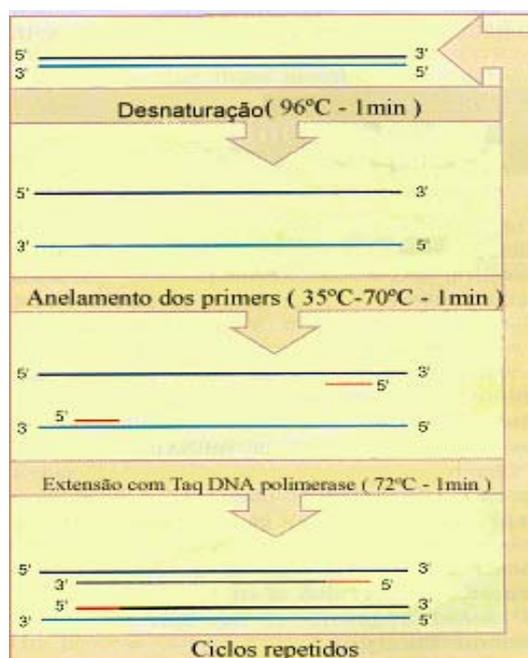


Figura 7 – Representação esquemática de um ciclo de PCR.

FONTE: LEWIN, 1997.

Segundo Persing (1993), a técnica da PCR tem sido bastante aplicada na identificação de diversos patógenos em amostras clínicas, o que comprova sua alta sensibilidade e especificidade para obter uma determinada seqüência de DNA, numa pequena quantidade de amostra amplificada, e essa técnica tem sido bastante utilizada como base para diagnosticar várias doenças infecciosas, principalmente as de difícil cultivo.

Portanto, os métodos mais completos em relação à sensibilidade e especificidade são o de detecção de ácidos nucleicos, dos quais a PCR está sendo utilizada há

mais tempo e é a mais difundida (HALLSWORTH et al., 1995; MICHELON et al., 2005; SEADI, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudar a prevalência de *Chlamydia trachomatis*, pela técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), em mulheres com diagnóstico de infertilidade no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes na cidade de Manaus.

3.2. Específico

- Amplificar por PCR das amostras endocervicais de pacientes atendidas na clínica de infertilidade do ambulatório do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes;
- Verificar a eficiência das enzimas *Taq* DNA polimerase recombinante da *LABTRADE* do Brasil Ltda e *Platinum Taq* DNA polimerase *High Fidelity*;
- Estudar a associação entre a infecção por *C. trachomatis* e a infertilidade feminina;
- Analisar as condições – sócio econômicas e demográficas da população do estudo;
- Sequenciar os produtos da PCR, positivos para *C. trachomatis*;
- Verificar, se houver, a variabilidade genética entre as amostras sequenciadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) no dia 01 de setembro de 2005, conforme a Resolução do CONCEP nº 196/96 (Anexo A).

4.1. Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, para estimar a prevalência da infecção genital por *C. trachomatis* em mulheres inférteis, através da detecção do agente etiológico por reação em cadeia de polimerase (PCR), seguindo-se a análise das seqüências dos produtos amplificados por PCR observando a variabilidade genética.

4.2. Universo de Estudo

4.2.1. População de Referência

O estudo teve como alvo a população de mulheres inférteis atendidas na clínica de infertilidade no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, situado na zona norte na cidade de Manaus, capital do estado do Amazonas (AM), no período de 04 de novembro de 2005 a 21 de julho de 2006.

A clínica de infertilidade atende a uma demanda de aproximadamente 80 pacientes por mês, sendo que o atendimento é feito uma vez na semana pela parte da manhã.

O presente trabalho foi realizado somente com mulheres que estavam de acordo

com os critérios de inclusão para diagnóstico de infertilidade, apresentando sinais e/ou sintomas clínicos de DIP.

Cada paciente foi contactada pelo telefone após a conclusão do resultado da PCR, para receber o resultado no Hospital e receber orientações e tratamento médico, em caso de resultados positivos.

4.2.2. População de Estudo

O estudo foi realizado com 106 mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Dona Francisca Mendes, Manaus – AM e todas tinham grande interesse em esclarecer as causas da infertilidade e se mostraram interessadas em participar da pesquisa. As mulheres que não foram incluídas não se enquadravam nos critérios de inclusão do estudo. As mulheres que utilizaram o serviço de infertilidade pela primeira vez, foram esclarecidas quanto aos objetivos da pesquisa e foi oferecida a oportunidade de serem testadas para clamídia, usando o teste baseado na amplificação do DNA chamado Reação em cadeia da polimerase (PCR).

Todas as pacientes que participaram do estudo responderam a um questionário padronizado onde foi possível avaliar o perfil sócio-econômico da população do estudo.

As pacientes recrutadas para o estudo tiveram que obedecer os seguintes critérios:

4.2.3. Critérios de Inclusão:

O critério utilizado para diagnóstico de infertilidade teve seguimento nesta ordem:

- Ter residência no estado do Amazonas há pelo menos um ano;
- Concordar em participar da investigação e assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) (Anexo B), após tomar conhecimento dos objetivos e da metodologia do estudo;
- Mulheres em idade reprodutiva que procuram atendimento na clínica de infertilidade do ambulatório do Hospital Dona Francisca Mendes e que

não conseguiram conceber por um período mínimo de um ano de tentativa.

4.2.4. Critérios de Exclusão:

- A desistência da paciente em participar da pesquisa;
- Mulheres com menos de um ano de tentativa para concepção;
- Mulheres apresentando sangramento vaginal;
- Mulheres em uso de cremes vaginais;
- Mulheres com diagnóstico de endometriose.

4.2.5. Procedimentos

As participantes do estudo foram abordadas individualmente antes de serem atendidas na clínica de infertilidade do ambulatório do Hospital Dona Francisca Mendes. Antes de serem examinadas pelo ginecologista, as participantes foram esclarecidas quanto aos objetivos do estudo, riscos associados ao estudo, benefícios e confidencialidade dos registros.

A participante que aceitou em participar do estudo assinou o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE) e em seguida foi aplicado um questionário padronizado (Anexo C).

No questionário foram avaliados os seguintes dados: idade, estado marital, nível de escolaridade, renda familiar, zona de moradia, gravidez ectópica, número de abortos, tipo de infertilidade, uso de antibióticos, número de gestações que terminaram em nascimento de criança viva e sobre comportamentos de risco, tais como o número de parceiros sexuais que tiveram na vida.

As mulheres que aceitaram participar do estudo foram mantidas em contato por telefone logo após o resultado do exame de PCR. Cada resultado de exame foi anexado devidamente em seus prontuários para posterior avaliação e tratamento pela médica responsável pelo setor de infertilidade.

4.2.6. Obtenção das Amostras

Com auxílio de escovas endocervicais (*cyto-brush*) (Figura 8) foram coletadas amostras correspondentes do endocérvice de mulheres inférteis que aceitaram em participar do estudo. Essas amostras foram colocadas em 400 μ L solução tampão (TE) (Tris HCL 10 mM e EDTA 1 mM) e mantidas no gelo até o momento do transporte ao laboratório onde foram congeladas a -20°C até o momento da extração do DNA (GRIFFAIS; THIBON, 1989).

Todas as amostras foram analisadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM da Universidade Federal do Amazonas, utilizando-se como método diagnóstico a Reação em Cadeia de Polimerase, para detectar a *C. trachomatis* (DONG; LI; ZHANG e LIU, 1998).



Figura 8 – Escova *cyto-brush* para coletas das amostras do endocérvice.

FONTE: Retirado de <<http://www.clinilab.fr>>. Acesso em: 30 junho 2005.

4.3. Método de Diagnóstico

O método de diagnóstico de escolha para detecção da *C. trachomatis* foi a PCR, que consiste em um processo cíclico no qual se produz grande quantidade de ácidos nucleicos a partir de pequenas quantidades de material coletado.

4.4. Preparação das amostras para PCR

4.4.1. Extração do DNA

Antes de iniciar a amplificação do DNA bacteriano, submeteu-se as amostras a serem analisadas a um processo de extração do DNA.

As amostras foram descongeladas e deixadas à temperatura ambiente. Em seguida, preparou-se a solução TPK¹.

Aos 400 µL da amostra adicionou-se 400 µL da solução de TPK e em seguida foi levada ao banho-maria à 56°C por 1 hora e fervura por 10 minutos. As amostras assim preparadas foram mantidas à -20° C até a sua utilização (BAUER e MANOS, 1998).

As amostras que apresentaram sangue foram submetidas à extração pelo método Fenol: Clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) (Anexo D).

4.4.2. Amplificação Controle do DNA Humano (PCR)

Para certificar-se que o processo de extração foi eficiente e como forma de controle da presença do DNA cromossomal humano amplificável realizou-se uma reação de PCR utilizando iniciadores ISØ5G que amplificam uma região microsatélite (GATA)₁₃ do cromossoma 15 humano (PONTES; ÂNGELO e ASTOLFI FILHO, 2003). Após a amplificação com ISØ5G evidenciou-se uma banda correspondente a 270 pares de bases (pb) que foi visualizada após análise em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídeo.

4.4.3. Sistema de PCR para Controle do DNA Humano

O sistema de PCR continha o volume final de 20,0 µL, composto por seguintes componentes: 2,2 µL H₂O Milli-Q; 2,5 µL do Tampão da enzima 10x; 2,5 µL de dNTP 2,5 mM; 2,5 µL de MgCl₂ 20 mM; 2,5 mM; 5,0 µL de iniciadores (*Primers*) ISØ5G 5 pmol; 0,3 µL da enzima *Taq* DNA polimerase 5U/µL e 5,0 µL da amostra de DNA.

A reação de PCR foi realizada em termociclador PXE 0.2 *Thermal Cycler* – *Electron Corporation* programada da seguinte maneira:

Pré-desnaturação por 2 minutos a 95°C;

¹ 900 µL de TE (Tris HCl 50 mM + EDTA 1 mM) pH 8,0
100 µL de Tween 20%
20 µL proteinase K 10 mg/mL).

- Desnaturalização por 1 minuto a 95°C;
 - Anelamento por 1 minuto a 55°C;
 - Extensão por 1 minuto a 72°C;
 - Extensão final por 5 minutos a 72°C.
- } **40 ciclos de amplificação**

O termociclador foi programado, para ao final dos ciclos conservar as amostras que foram amplificadas a 4°C até que sejam retiradas e congeladas.

4.4.4. Eletroforese em Gel de Agarose 2,5%

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2,5% (p/v) em solução Tampão 1x. A corrida iniciou-se com 70 volts até a entrada dos produtos amplificados no gel e em seguida aumentava-se a voltagem para 110 volts até o final da corrida com duração aproximadamente de duas horas. Utilizou-se como marcador, o “ladder” múltiplo de 100 pb da *Invitrogen*. Corou-se o gel com brometo de etídeo (1µg/µL) por aproximadamente 20 a 30 minutos e depois fotografado no transluminador com luz ultravioleta.

4.5. Amplificação do DNA Plasmidial da *Chlamydia trachomatis* (PCR)

4.5.1. Oligonucleotídeos (*PRIMERS*)

Foram utilizados os iniciadores que amplificam um fragmento de 241 pb do DNA plasmidial da *C. trachomatis*, descritos por (MAHONY et al., 1993; SCHACHTER, 1997). Segundo Schachter (1997), os *primers* foram denominados KL1 e KL2 e suas seqüências estão apresentadas a seguir:

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQÜÊNCIA 5' → 3'
KL1	TCCggAgCgAgTTACgAAgA
KL2	AATCAATgCCCgggATTggT

Estes iniciadores exibem maior sensibilidade em virtude de a *C. trachomatis* exibir de 7 a 10 plasmídios por célula bacteriana (PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999; PERSING, 1993).

4.5.2. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por PCR

As 106 amostras foram submetidas a dois processos de análise e comparação da PCR usando a enzima comum: *Taq* DNA Polimerase recombinante *LABTRADE* do Brasil Ltda e enzima *Platinum*[®] *Taq* DNA Polymerase High Fidelity da Invitrogen Life Technologies. Os sistemas são semelhantes, porém apresentam alterações peculiares a cada enzima.

4.5.3. Sistema de PCR usando a *Taq* DNA Polimerase recombinante *LABTRADE* do Brasil Ltda para detectar DNA plasmidial da *Chlamydia trachomatis*

O sistema de reação continha o volume final de 50 μ L, composto por 5,0 μ L de DNA; 5,0 μ L do Tampão 10x; 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM; 1,0 μ L de dNTP 10,0 mM; 5,0 μ L do iniciador KL1 5 pmol; 5,0 μ L do iniciador KL2 5 pmol; 0,5 μ L de *Taq* DNA polimerase 5U/ μ L e 27 μ L de água Milli-Q para completar o volume de 50 μ L.

A amplificação de DNA plasmidial de *Chlamydia trachomatis* foi processada em termociclador PXE 0.2 *Thermal Cycler Thermo Electron Corporation* programada para realizar o seguinte termociclo:

- Pré-desnaturação a 94°C por 2 minutos;
 - Denaturação a 94°C por 1 minuto;
 - Anelamento a 64°C por 1 minuto;
 - Extensão a 72°C por 2 minutos.
- } **35 ciclos de amplificação**

No final, deixa-se mais uma temperatura de extensão a 72°C por 5 minutos. O termociclador foi programado para, ao término dos ciclos, conservar as amostras a serem estudadas numa temperatura de 4°C.

4.5.4. Sistema de PCR usando a *Platinum*[®] *Taq DNA Polymerase High Fidelity* da Invitrogen *Life Technologies* para detectar DNA plasmidial da *Chlamydia trachomatis*

O sistema de reação foi composto de 5,0 µL de DNA; 5,0 µL do Tampão 10x; 2,0 µL de MgSO₄ 50 mM; 1,0 µL de dNTP 10,0 mM; 5,0 µL do iniciador KL1 5 pmol; 5,0 µL do iniciador KL2 5 pmol; 0,2 µL de *Platinum*[®] *Taq DNA polymerase High Fidelity* 5U/µL e 26,8 µL de água Milli-Q totalizando o volume de 50 µL.

A amplificação de DNA plasmidial de *C. trachomatis* foi processada em termociclador PXE 0.2 *Thermal Cycler Thermo Electron Corporation* programada para realizar o seguinte termociclagem:

- Pré-desnaturação a 94°C por 30 segundos;
 - Desnaturação a 94°C por 30 segundos;
 - Anelamento a 64°C por 30 segundos;
 - Extensão a 68°C por 2 minutos.
- } **40 ciclos de amplificação**

Na síntese final, deixa-se mais uma temperatura de extensão a 68°C por 5 minutos. Ao término dos ciclos, o termociclador foi programado para conservar as amostras numa temperatura de 4°C.

4.5.5. Eletroforese em Gel de Agarose 2%

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2% (p/v) em solução Tampão 1x, nas seguintes condições: 70 volts até a entrada dos produtos amplificados no gel e aumentou-se a voltagem para 110 volts até a amostra chegar no final da corrida com duração aproximadamente de duas horas. Foi utilizado como marcador o “ladder” múltiplo de 100 pb da *Invitrogen*. O gel foi corado com brometo de etídeo (1µg/µL) por aproximadamente 20 a 30 minutos e fotografado no transluminador com luz ultravioleta. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram banda de 241 pb, comparando ao marcador de peso molecular na posição correspondente.

4.6. Seqüenciamento das Amostras Amplificadas pela PCR

Os produtos amplificados por PCR foram submetidos à purificação através das enzimas *Exo* e *Sap*. Foi utilizado 2 µL de *Exo* e *Sap* e 12 µL do produto da PCR e incubou-se posteriormente no termociclador PXE 0.2 *Thermal Cycler Thermo Electron Corporation* por 1 hora e 30 minutos a 37°C e 80°C. Em seguida, os produtos que foram purificados foram submetidos à reação de seqüenciamento com um volume final de 10 µL, contendo os seguintes reagentes:

- 4,0 µL do produto amplificado por PCR a ser analisado.
- 1,0 µL de cada iniciadores KL1 ou KL2 (5 pmol/µL);
- 3,0 µL de H₂O Milli-Q autoclavada;
- 2,0 µL de Pré-mix (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing kit for MegaBACE* da *Amersham Bioscience*).

Após a montagem da reação de seqüenciamento levou-se ao termociclador PXE 0.2 *Thermal Cycler Thermo Electron Corporation* e realizou-se a seguinte ciclagem:

- 95°C por 25 seg;
 - 95°C por 15 seg;
 - 50°C por 20 seg;
- } **30 ciclos de amplificação**

- 60°C por 1 min;
- 4°C até a retirada do termociclador (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2002).

Ao término da reação, os produtos foram precipitados com 1,0 µL de acetato de amônia e 27,5 µL de etanol absoluto. Utilizou-se o agitador (vortex) por 1 minuto e incubou-se a mistura por 20 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz.

Em seguida, centrifugou-se a placa que continha a mistura à temperatura de 4°C por 40 minutos a 4.000 rpm. O conteúdo foi descartado e adicionou-se 120 µL de etanol 70% gelado e a placa foi centrifugada por 10 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante com vigor e a placa foi centrifugada de forma invertida. Deixou-se secar a placa até evaporar o etanol e o material foi ressuspenso em 10 µL de tampão de corrida (formamida a 70% e EDTA 1 mM) e centrifugada por alguns segundos.

Ao término da precipitação, os produtos foram aplicados em eletroforese capilar de gel de poliacrilamida e submetidos à corrida por aproximadamente 5 horas no seqüenciador automático *MegaBACE 1000 DNA Analysis System*.

4.6.1. Análise das seqüências dos produtos amplificados por PCR

A análise comparativa de genomas é considerada uma metodologia recente tendo início com o seqüenciamento dos primeiros genomas na década de 1990 (CATANHO, 2005).

Segundo Catanho (2005), no que se refere aos microrganismos patogênicos, a análise de seqüências genômicas tem várias aplicações potenciais, visando, principalmente no diagnóstico.

Portanto, para verificar a variabilidade genética e confirmar as bandas correspondentes a 241 pb dos produtos da PCR para *C. trachomatis* realizou-se o seqüenciamento de dez amostras no *MegaBACE 1000 DNA Analysis System*.

Após o seqüenciamento, analisou-se seqüências nucleotídicas das amostras utilizando-se programa de Bioinformática BLAST/BLAST N através do site <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>> (ALTSCHUL et al., 1997).

4.7. Metodologia Estatística

A amostra utilizada na análise foi composta por 106 pacientes com infertilidade submetidas ao teste de PCR para *C. trachomatis*, atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes da cidade de Manaus – Am.

Os dados foram apresentados através de tabelas e gráficos onde se calcularam as frequências absolutas simples e relativas para os dados qualitativos e médias, mediana e desvio-padrão (DP) para os dados quantitativos.

Para avaliar a associação entre as variáveis categóricas e o resultado do PCR para *C. trachomatis* utilizou-se a Estatística de Teste Qui-quadrado de *Pearson* e na comparação das médias de idade o teste *T de Student*.

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info 3.3 *for Windows* desenvolvido e distribuído pelo *CDC* e o nível de significância utilizado nos testes foi de 5%.

5 RESULTADOS

O estudo realizado com as 106 mulheres obteve os seguintes resultados:

5.1. Amplificação Controle do DNA Humano (PCR)

A Figura 9 demonstra o resultado da PCR para controle do DNA humano das pacientes que procuraram serviço de infertilidade no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes utilizando os primers ISØ5G que amplificam um fragmento de 270 pb correspondente a uma região microsatélite (GATA)₁₃ do cromossoma 15 humano. Os produtos amplificados foram analisados em gel de Agarose a 2,5%, corado com brometo de etídeo.

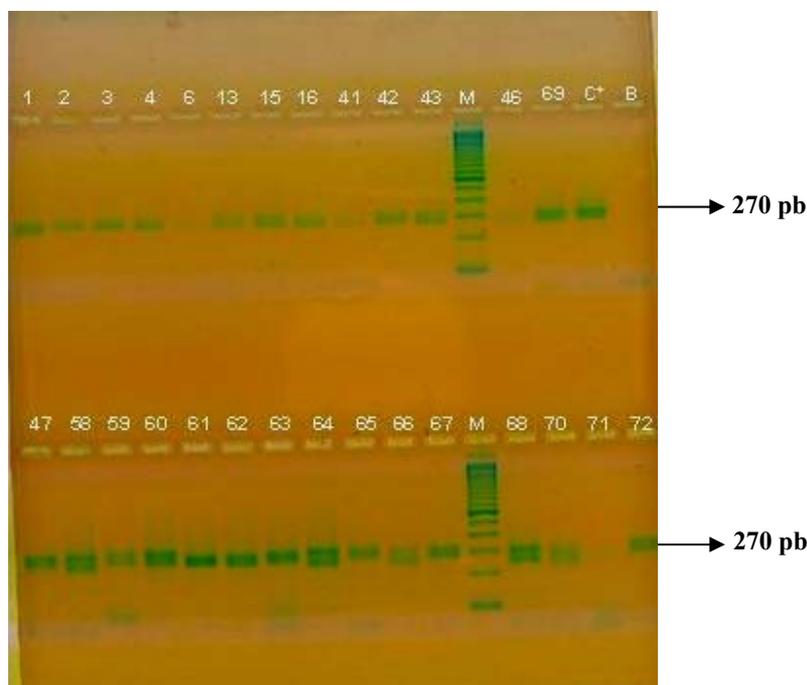


Figura 9 Perfil eletroforético em gel de Agarose 2,5% corado com brometo de etídeo evidenciando uma banda de 270 pb correspondente a amplificação de uma região microsatélite (GATA)₁₃ do cromossoma 15 humano utilizando-se iniciadores ISØ5G 5 pmol (PONTES; ÂNGELO e ASTOLFI FILHO, 2003); M: Marcador de peso molecular 100 pb da *INVITROGEN Life Technologies*; Amostras: 1, 2, 3, 4, 6, 13, 15, 16, 41, 42, 43, 46, 69, 47, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 71, 72; C⁺: Controle Positivo; B: Branco.

5.2. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por PCR

Os dois sistemas testados por PCR foram semelhantes, porém com as alterações peculiares a cada enzima, conforme descrito no item Materiais e Métodos.

Com o sistema da *Taq* DNA Polimerase *LABTRADE* do Brasil observamos poucas bandas que foram amplificadas detectando apenas 5,7% de positividade para DNA plasmidial de *C. trachomatis*, como podemos observar nas Figura 10, Figura 11.

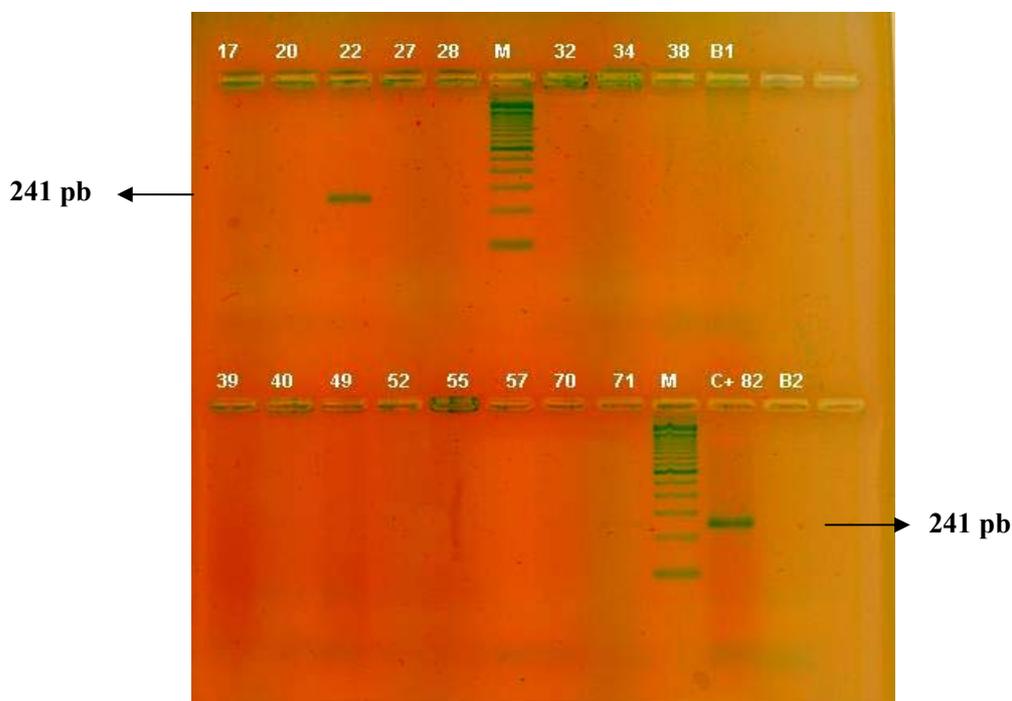


Figura 10 Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etideo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241 pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Taq* DNA Polimerase recombinante da *LABTRADE* do Brasil Ltda; M: Marcador de peso molecular 100 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras: 17, 20, 22, 27, 28, 32, 34, 38, 39, 40, 49, 52, 55, 57, 70, 71; C+: Controle Positivo; B: Branco.

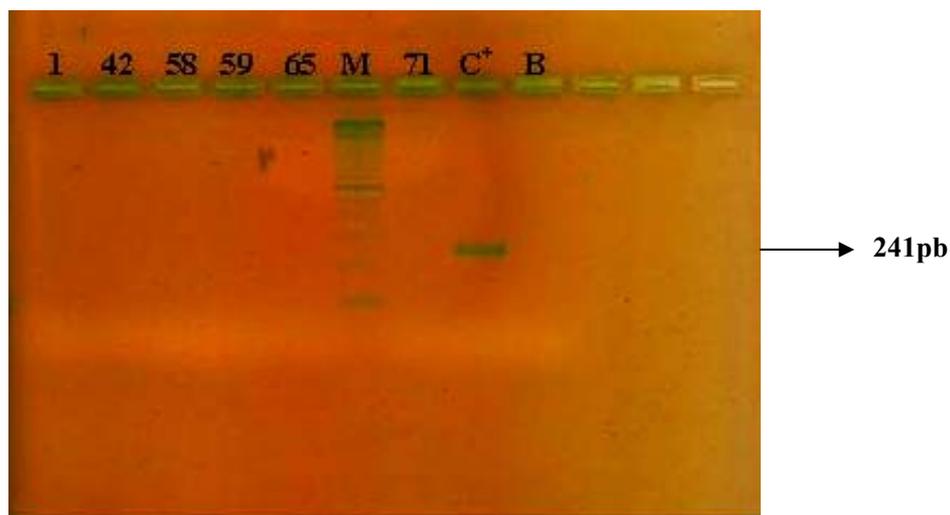


Figura 11 Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241 pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Taq* DNA Polimerase recombinante da *LABTRADE* do Brasil Ltda; M: Marcador de peso molecular 100 pb da *INVITROGEN Life Technologies*; Amostras: 1, 42, 58, 59, 65, 71; C+: Controle Positivo; B: Branco.

Utilizando-se a *Platinum*[®] *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* observamos que as mesmas amostras que foram analisadas anteriormente com a *Taq* DNA polimerase *LABTRADE* do Brasil, foram em sua maioria positivas para DNA plasmidial de *C. trachomatis*, resultando como podemos observar nas Figura 12, Figura 13, Figura 14 e Anexo E (Figura 16, Figura 17 e Figura 18).

O resultado diagnóstico utilizando-se a *Platinum*[®] *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* foi diferente do anterior, pois evidenciamos uma prevalência de 52,8% das pacientes do estudo positivas para *C. trachomatis*.

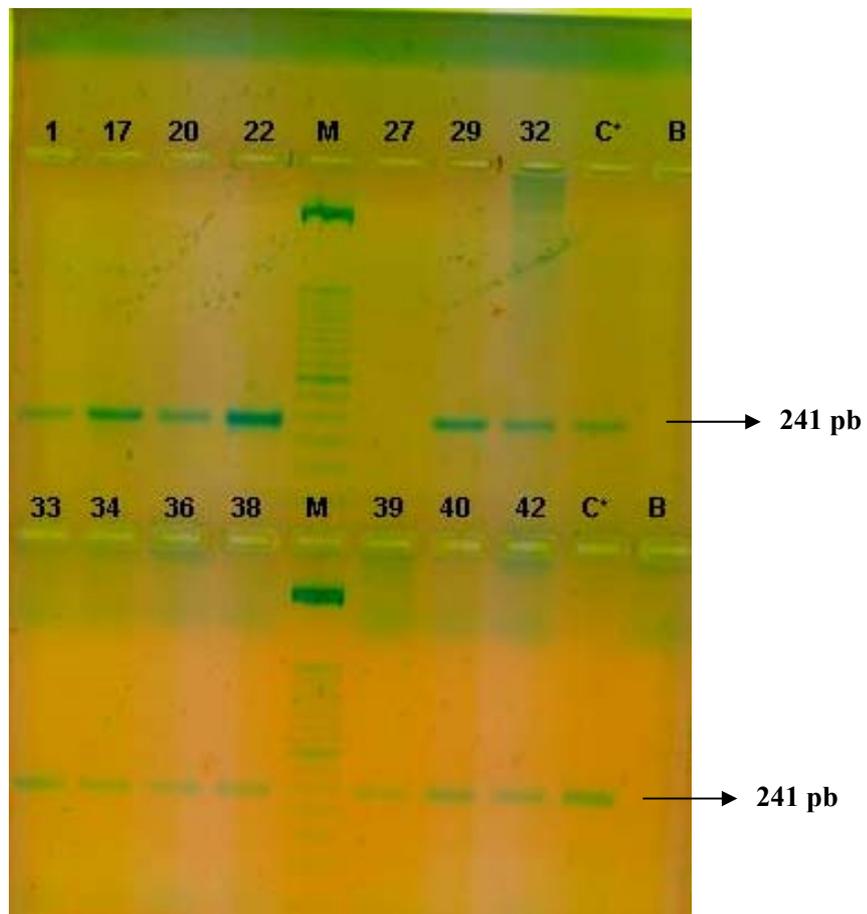


Figura 12 Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241 pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity*; M: Marcador de peso molecular 100 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras: 1, 17, 20, 22, 27, 29, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 40, 42; C+: Controle Positivo; B: Branco.

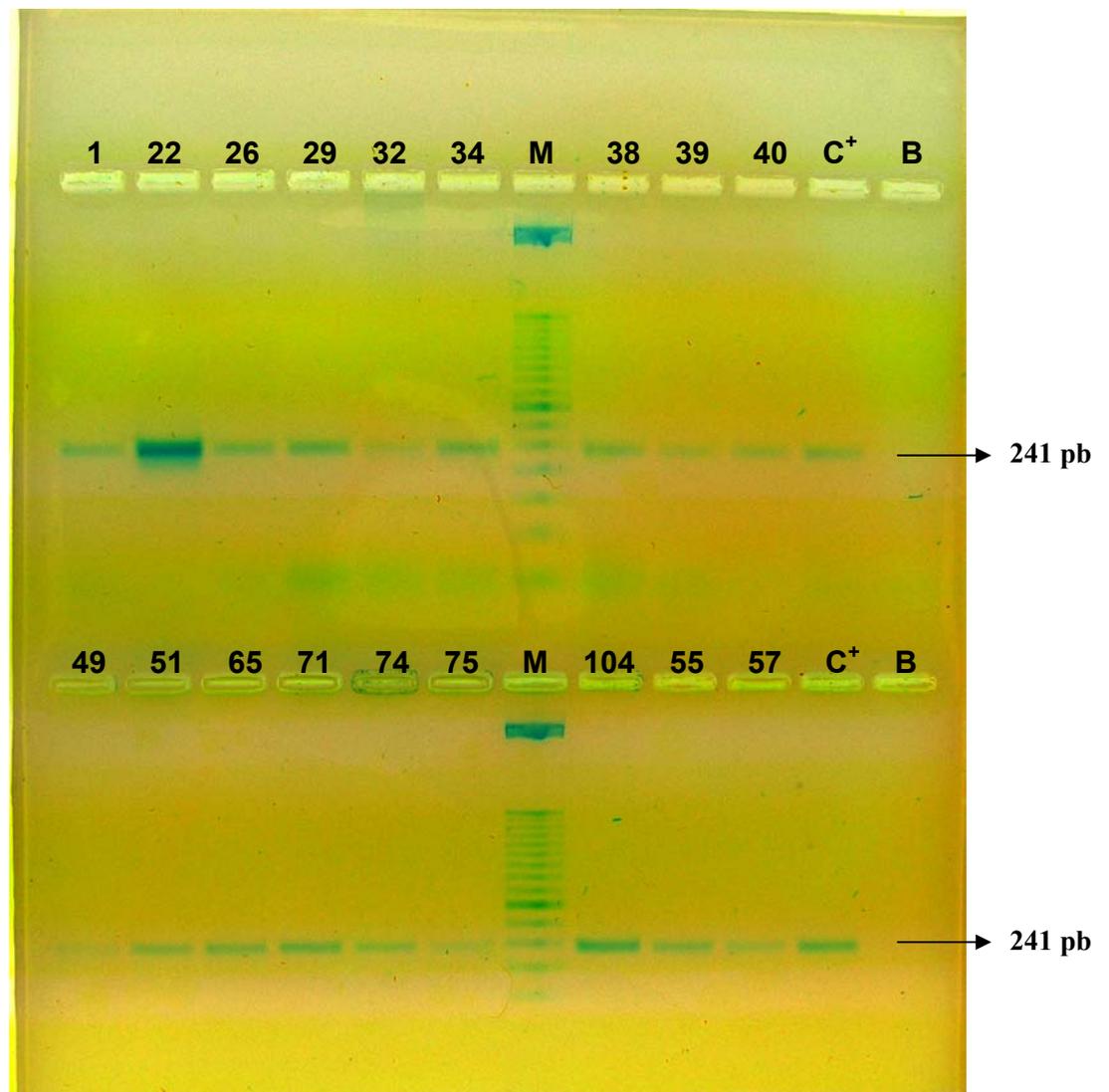


Figura 13 Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo (1 µg/µL) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241 pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity*; M: Marcador de peso molecular 100 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras: 1, 22, 26, 29, 32, 34, 38, 39, 40, 49, 51, 65, 71, 74, 75, 104, 55, 57; C⁺: Controle Positivo; B: Branco.

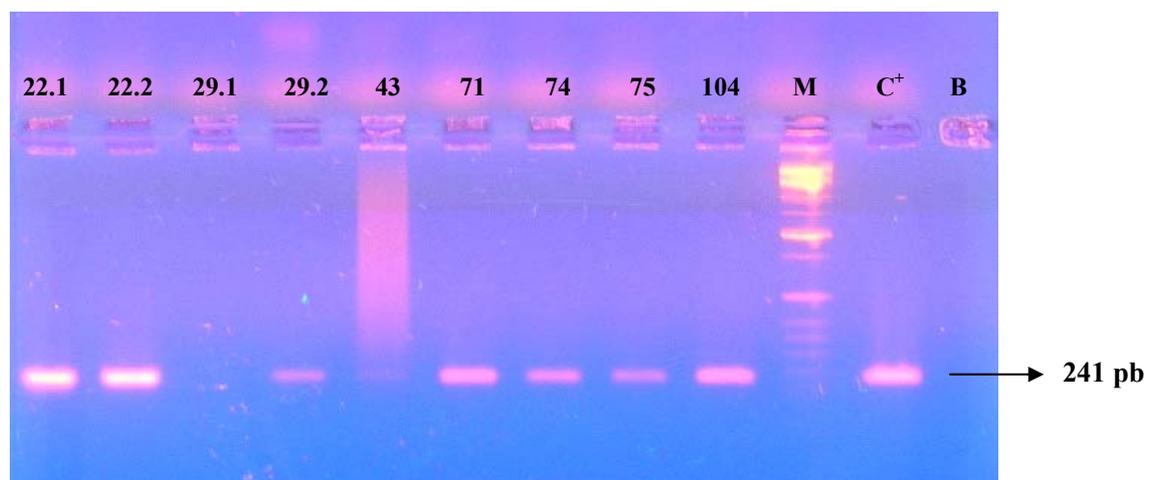


Figura 14 Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241 pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity*; M: Marcador de peso molecular 100 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; M: Marcador de peso molecular 100 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras: 22.1, 22.2, 29.1, 29.2, 43, 71, 74, 75, 104; C⁺: Controle Positivo; B: Branco.

5.3. Eletroforese em gel de Poliacrilamida a 6% de produtos amplificados com bandas fracas

Observou-se que algumas bandas apresentavam-se fracas ainda com a utilização da *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity*. Para elucidar estas dúvidas analisou-se os produtos que apresentaram bandas fracas em gel de Poliacrilamida a 6% e confirmou-se que essas amostras são realmente positivas e oriundas do plasmídio de *C. trachomatis* (Figura 15).

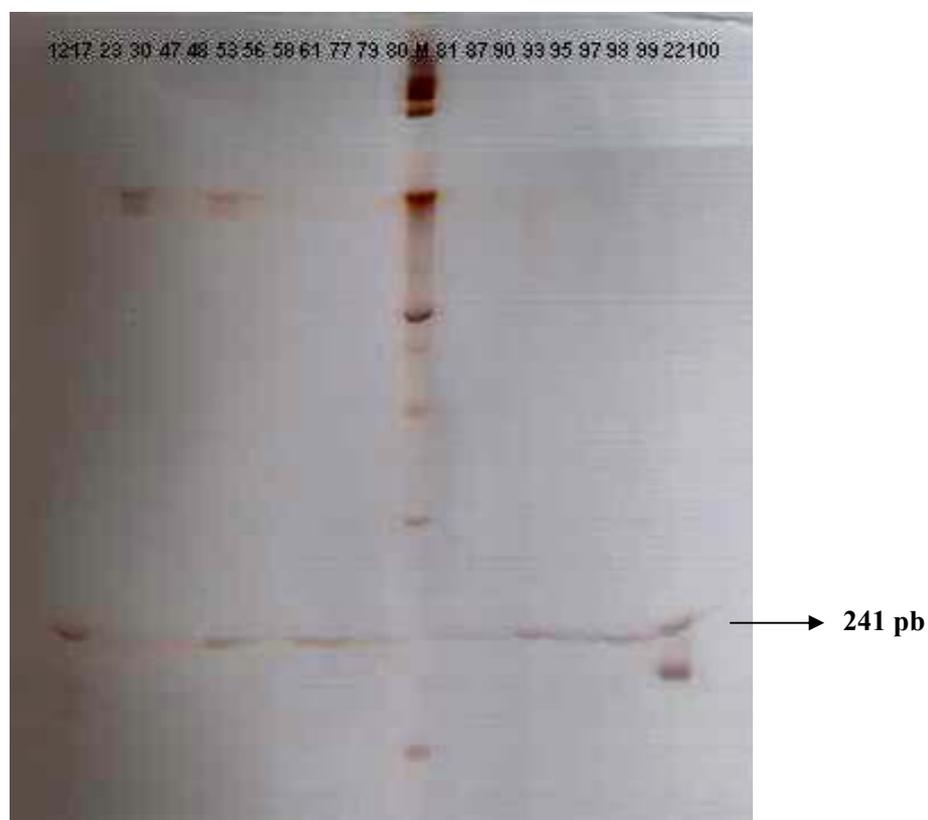


Figura 15 Perfil eletroforético em gel de Poliacrilamida 6,0% corado com Nitrato de Prata 0,2% dos produtos amplificados com bandas fracas por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241 pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity*; M: Marcador de peso molecular 100 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; M: Marcador de peso molecular 100 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras: 12, 17, 23, 30, 47, 48, 53, 56, 58, 61, 77, 79, 80, 81, 87, 90, 93, 95, 97, 98, 99, 22, 100.

5.4. Prevalência de *Chlamydia trachomatis*

Das 106 mulheres que fizeram parte do estudo, 56 (52,8%) foram positivas quando testadas por PCR para pesquisa de *C. trachomatis* utilizando-se os primers KL1 e KL2 (Gráfico 1) utilizando-se a *Platinum® Taq* DNA polimerase *High Fidelity*, enquanto quando utilizou-se a *Taq* DNA polimerase recombinante da *Labtrade* do Brasil esta prevalência foi de 5,7% (Gráfico 2).

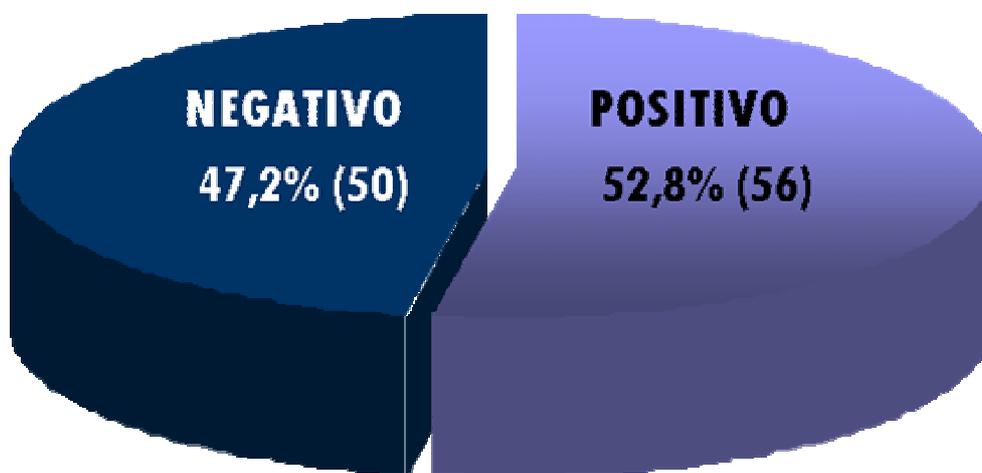


Gráfico 1 Distribuição segundo o resultado do PCR utilizando-se a *Platinum® Taq* DNA polimerase *High Fidelity* para *Chlamydia trachomatis* das mulheres com diagnóstico de infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 04 de novembro de 2005 a 21 de julho de 2006, na cidade de Manaus-AM.

Em relação ao diagnóstico molecular a utilização da *Platinum[®] Taq* DNA polimerase *High Fidelity* mostrou maior eficácia na amplificação do DNA plasmidial da *C. trachomatis*.

Portanto, para fins epidemiológicos considerou-se a maior prevalência encontrada (52,8%), já que retrata com maior fidelidade o perfil da população estudada.

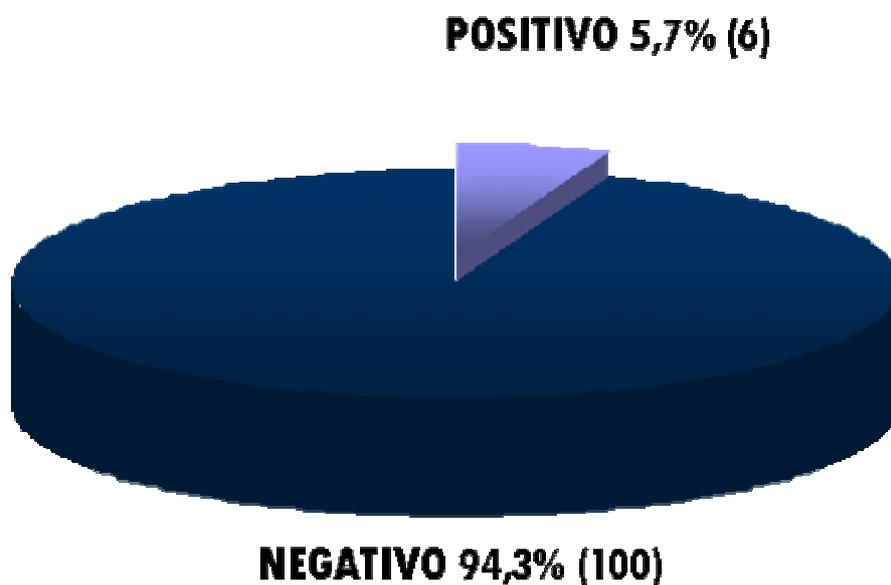


Gráfico 2 Distribuição segundo o resultado do PCR utilizando-se a *Taq* DNA polimerase recombinante da *Labtrade* do Brasil para *Chlamydia trachomatis* das mulheres com diagnóstico de infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 04 de novembro de 2005 a 21 de julho de 2006, na cidade de Manaus-AM.

5.5. Características da população do estudo

O estudo das variáveis sócio-demográficas das 106 mulheres que participaram do estudo (Tabela 3) mostra idade, estado marital, nível de escolaridade, renda família e zona de moradia.

A idade média das pacientes foi de 32,0 anos ($\pm 4,8$ DP).

A maioria das participantes (45,4%) que freqüentaram a clínica de infertilidade apresentaram ensino médio completo. Quando questionadas sobre seu estado civil, 90,6% declararam união estável com seus parceiros. Quanto a renda familiar, era em torno de dois a quatro salários mínimos. De acordo com o levantamento feito das zonas de residência das pacientes estudadas, maioria (27,4%) reside na zona leste da cidade de Manaus.

Variáveis (n = 106)	n	%
Idade (Anos)		
< 25	6	5,6
25 --- 30	41	38,7
> 30	59	55,7
Média ± DP	32,0 ± 4,8	
Mediana	31,0	
Estado marital		
Solteira	9	8,5
União Estável	96	90,6
Divorciada/Separada	1	0,9
Nível de escolaridade		
Ensino Fundamental Incompleto	17	16,0
Ensino Fundamental Completo	9	8,5
Ensino Médio Incompleto	8	7,5
Ensino Médio Completo	48	45,4
Profissionalizante	3	2,8
Ensino Superior Incompleto	7	6,6
Ensino Superior Completo	14	13,2
Renda familiar (Salário Mínimo)		
Sem Renda	4	3,8
Um	12	11,3
Dois a Quatro	47	44,3
Cinco a Seis	29	27,4
Mais de Seis	14	13,2
Zona		
Norte	26	24,5
Leste	29	27,4
Centro-Oeste	11	10,4
Oeste	14	13,2
Centro-Sul	13	12,3
Sul	11	10,4
Interior do Estado	02	1,9

Tabela 3 Distribuição segundo as variáveis sócio-demográficas das mulheres com infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes da cidade de Manaus-AM.

Fonte: Entrevista realizada com as pacientes que participaram do estudo.

5.5.1. Característica da população do estudo quanto ao resultado do PCR para *Chlamydia trachomatis*

Entre as 106 mulheres que participaram do estudo e que referiram ter tido três ou mais parceiros sexuais durante sua vida reprodutiva, 48,2% apresentaram positividade para *C. trachomatis*, enquanto que 21,4% das mulheres com PCR positiva para *C. trachomatis* teve apenas um parceiro (Tabela 4).

Número de parceiros sexuais na vida	PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>				Total
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
Um	12	21,4	8	16,0	20
Dois	14	25,0	7	14,0	21
Três ou Mais	27	48,2	32	64,0	59
Não Relatou	3	5,4	3	6,0	6
Total	56	52,8	50	47,2	106

$$\chi^2 = 3,22; \quad p\text{-valor } 0,3578$$

Tabela 4 Descrição do número de parceiros sexuais das mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, na cidade de Manaus - AM.
Fonte: Entrevista realizada com as pacientes que participaram do estudo.

Das 56 mulheres positivas para *C. trachomatis* apenas 3 (5,4%) relatavam episódio de gravidez ectópica, enquanto que das 50 mulheres negativas para *C. trachomatis* apenas 1 (2,0%) relatava episódio de gravidez ectópica (Tabela 5).

Gravidez ectópica	PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>				Total
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
Sim	3	5,4	1	2,0	4
Não	53	94,6	49	98,0	102
Total	56	52,8	50	47,2	106

χ^2 - Yates= 0,15; p-valor 0,6929

Tabela 5 Distribuição segundo gravidez ectópica das mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, na cidade de Manaus - AM.

Fonte: Entrevista realizada com as pacientes que participaram do estudo.

Durante o acompanhamento da coleta do material endocervical, observou-se as características na região da cérvix, presença de secreção como também a sua cor e odor. Das mulheres infectadas por clamídia, 14,3% apresentavam cervicite no exame especular enquanto que a maioria (85,7%) não apresentaram sinais de cervicite (Tabela 6).

Exame Especular	PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>				Total
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
Cervicite	8	14,3	3	6,0	11
Sem Cervicite	48	85,7	47	94,0	95
Total	56	52,8	50	47,2	106

χ^2 - Yates= 1,16; p-valor 0,2813

Tabela 6 Descrição do exame especular das mulheres atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, na cidade de Manaus - AM.

De acordo com os valores encontrados no estudo dos dados sócio-demográficos com relação a PCR para *C. trachomatis*, verificou-se que houve significância estatística entre as pacientes positivas e negativas (p-valor > 0,05) referente à renda familiar (p-0,0274). Em relação às zonas de moradias das pacientes que participaram da pesquisa, a zona leste foi a região com maior número de mulheres que procuraram tratamento para infertilidade e que foram positivas à PCR (28,6%). Quanto a renda familiar, 33,9% das mulheres apresentavam uma renda entre dois a quatro salários mínimos.

Não houve significância estatística em relação à idade das pacientes (p-0,8697), estado marital, nível de escolaridade e zona residencial. Com relação as variáveis de estado marital, nível de escolaridade e zona residencial, não foi possível aplicar a Estatística de Teste por existirem mais de 20% de valores esperados inferiores a cinco unidades, pois, quando existem valores zerados ou valores esperados inferiores a 5 unidades o teste do qui-quadrado não pode ser utilizado (Tabela 7).

Variáveis	PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>				p-valor
	Positivo (n = 56)		Negativo (n = 50)		
	n	%	n	%	
Idade (Anos)					
< 25	4	7,1	2	4,0	
25 --- 30	23	41,1	18	36,0	
> 30	29	51,8	30	60,0	
Média ± DP	32,0 ± 4,9		31,9 ± 4,7		0,8697**
Mediana	31,0		32,0		
Estado Marital					
Solteira	6	10,7	3	6,0	*
União Estável	49	87,5	47	94,0	
Divorciada/Separada	1	1,8	-	-	
Nível de Escolaridade					
Fundamental Incompleto	7	12,5	10	20,0	*
Fundamental Completo	3	5,4	6	12,0	
Médio Incompleto	4	7,1	4	8,0	
Médio Completo	25	44,6	23	46,0	
Profissionalizante	1	1,8	2	4,0	
Superior Incompleto	7	12,5	-	-	
Superior Completo	9	16,1	5	10,0	
Renda familiar (SM)					
Sem Renda	3	5,4	1	2,0	0,0274***
Um	8	14,3	4	8,0	
Dois a Quatro	19	33,9	28	56,0	
Cinco a Seis	14	25,0	15	30,0	
Mais de Seis	12	21,4	2	4,0	
Zona					
Norte	11	19,6	15	30,0	*
Leste	16	28,6	13	26,0	
Centro-Oeste	4	7,1	7	14,0	
Oeste	4	7,1	10	20,0	
Centro-Sul	11	19,6	2	4,0	
Sul	8	14,3	3	6,0	
Interior do Estado	2	3,6	-	-	

Tabela 7 Distribuição segundo as variáveis sócio-demográficas em relação ao resultado do PCR para *Chlamydia trachomatis* das mulheres com infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes da cidade de Manaus - AM.

Valor em negrito itálico indica diferença estatisticamente significativa ao nível de 5%.

* Não foi possível aplicar a Estatística de Teste por existirem mais de 20% de valores esperado inferiores a cinco unidades. ** Teste T de Student; *** Teste do qui-quadrado de *Pearson*.

Observando a tabela 8 verificou-se que das 56 mulheres positivas para *C. trachomatis*, 31 (55,4%) nunca tinham engravidado, enquanto 9 (16%) já haviam engravidado, porém a gravidez não resultou em criança viva, 13 (23,2%) resultaram em gravidez de uma criança viva e 3 (5,4%) resultaram em duas crianças vivas.

Ainda observando tabela 8 verificou-se que das 56 pacientes positivas para *C. trachomatis*, 16 (28,6%) apresentaram história de aborto, enquanto que 40 (71,4%) não relataram abortos. Portanto, observou-se que das 27 pacientes que relataram histórico de aborto 16 (59,2%) foram positivas por PCR para *C. trachomatis*. Quanto ao tipo de infertilidade das 56 mulheres positivas para *C. trachomatis* 31 (55,4%) relataram histórico de infertilidade primária e 25 (44,6%) com infertilidade secundária. Quanto ao uso de antibióticos 18 (32,1%) relataram uso de antibiótico e 38 (67,9%) não haviam usado nenhum antibiótico. Na tabela 8 nenhuma das variáveis estudadas mostrou significância estatística. Todos os valores encontrados para p-valor estavam acima de 0,05, ou seja, p-valor > 0,05 (Tabela 8).

Variáveis	PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>				p-valor *
	Positivo (n = 56)		Negativo (n = 50)		
	n	%	n	%	
Número de gestações que terminaram em nascimento de criança viva					0,5614
Nunca Engravidou	31	55,4	30	60,0	
Não teve crianças vivas	9	16,0	7	14,0	
Uma	13	23,2	8	16,0	
Duas	3	5,4	5	10,0	
Aborto					0,4382
Sim	16	28,6	11	22,0	
Não	40	71,4	39	78,0	
Tipo de infertilidade					0,6293
Primária	31	55,4	30	60,0	
Secundária	25	44,6	20	40,0	
Uso de antibióticos					0,2423
Sim	18	32,1	11	22,0	
Não	38	67,9	39	78,0	

Tabela 8 Distribuição segundo as variáveis clínicas em relação ao resultado do PCR para *Chlamydia trachomatis* das mulheres com infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes da cidade de Manaus-AM.

* Teste do qui-quadrado de *Pearson*.

5.6. Sequenciamento dos produtos amplificados por PCR

Para confirmação das bandas correspondentes a 241 pb dos produtos da PCR para *C. trachomatis* realizou-se o sequenciamento de dez amostras no *MegaBACE 1000 DNA Analysis System*. Após o sequenciamento, as amostras foram analisadas utilizando-se programa de Bioinformática BLAST/BLAST N descritos no item 3.6.1 (Análise das seqüências dos produtos amplificados por PCR) e verificou-se homologia com a seqüência do DNA plasmidial de *C. trachomatis* (DQ063827-C).

As amostras foram analisadas e comparadas com seu protótipo no *Gene Bank* (DQ063827-C) e observou-se mínima variabilidade genética que variou de 1,1% a 3,3% conforme observa-se na Tabela 9 e Quadro 2.

Amostras	Variações %	Nucleotídeos
17	1,7	181
20	1,1	181
22	1,1	181
29	1,7	181
33	2,2	181
36	3,3	181
71	1,1	181
74	1,1	181
75	1,1	181
104	1,7	181

Tabela 9 Variações de nucleotídeos nas amostras seqüenciadas.

Observou-se que o sítio para a enzima de restrição *Hind III* manteve-se preservado em todas as 10 (dez) amostras seqüenciadas.

O Quadro 2 mostra o número de mutações ao analisar as seqüências dos produtos amplificados por PCR. Verificou-se as seguintes mutações: 6 (seis) transições, 10 transversões e 3 (três) deleções ao se analisar as 10 (dez) amostras seqüenciadas.

	5	15	25	35	45	55	65
DQ063827-C	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 17	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 20	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 22	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 29	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 33	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 36	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 71	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 74	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 75	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
Amostra 104	TAAACTTCTG	AGGATAAGTT	ATAATAATCC	TCTTTTCTGT	CTGACGGTTC	TTAAGCTGGG	AGAAAGAAAT
	75	85	95	105	115	125	135
DQ063827-C	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 17	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 20	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 22	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 29	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 33	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 36	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 71	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 74	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 75	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
Amostra 104	GGTAGCTTGT	TGGAACAAA	TCTGACTAAT	CTCCAAGCTT	AAGACTTCAG	AGGAGCGTTT	ACCTCCTTGG
	145	155	165	175			
DQ063827-C	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTT	T		
Amostra 17	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 20	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 22	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 29	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 33	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 36	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 71	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 74	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 75	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		
Amostra 104	AGCATTGTCT	GGGCGATCAA	CCAATCCCGG	GCATTGATTA	A		

Quadro 2 Comparação dos produtos amplificados da PCR das amostras 17, 20, 22, 29, 33, 36, 71, 74, 75 e 104 com a seqüência do plasmídeo de *Chlamydia trachomatis*. AAGCTT – sítio de *Hind III* – C, C, T, A – mutações; DQ063827-C – seqüência do plasmídeo depositada no GenBank. Análise realizada no Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos da Universidade de Brasília (UNB) através do programa BLAST/BLAST N (ALTSCHUL et al., 1997) seguida de análise no BioEdit utilizando o programa Clustal.

Fonte: <http://www.unb.br> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

6. DISCUSSÃO

A infecção por *C. trachomatis* é considerada a DST de maior prevalência reconhecida mundialmente. A magnitude da morbidade associada com as infecções causadas por clamídia é considerada elevada. Segundo Paavonen e Eggert-Kruse (1999), as manifestações e conseqüências de infecções por clamídia traz maiores danos na saúde reprodutiva das mulheres do que em homens. Devido a clamídia trazer conseqüências graves para a saúde da população, resolveu-se fazer um estudo de prevalência com mulheres que apresentam problemas de fertilidade usando um método de diagnóstico eficaz como a PCR.

6.1. Importância da enzima no diagnóstico molecular

Neste trabalho foram avaliadas 106 mulheres com diagnóstico de infertilidade atendidas na clínica de infertilidade do Hospital Universitário D. Francisca Mendes, nas quais verificou-se a prevalência de *C. trachomatis* nesta população, por PCR, utilizando-se dois sistemas similares, porém diferindo na enzima utilizada na reação. O primeiro sistema utilizou a *Taq* DNA polimerase recombinante da *LABTRADE* do Brasil Ltda. onde se encontrou uma prevalência de 5,7%. Assim, como a literatura relata alta prevalência desta bactéria na população estudada conforme mostram os trabalhos realizados por Akanda (2003) e Barlow et al. (2001) com prevalência de 71% e 73%, este resultado gerou um certo descontentamento, pois apresentava baixa prevalência e algumas bandas se apresentavam muito fracas, deixando dúvidas no resultado final.

Analisaram-se os dados mencionados acima e decidiu-se usar uma enzima mais potente, com alto poder de fidelidade e especificidade na reação. Optou-se assim, por

repetir todos os ensaios da PCR utilizando-se a *Platinum[®] Taq DNA polymerase High Fidelity* da INVITROGEN *Life Technologies*.

A escolha da *Platinum[®] Taq DNA polymerase High Fidelity* da INVITROGEN *Life Technologies* deve-se ao fato da enzima possuir as seguintes características: possui fidelidade 6 vezes maior em relação a *Taq* polimerase comum, alta especificidade com a incorporação da *Platinum[®]* “hot-start” e amplificam fragmentos até 15 kb (SCHUSTER et al., 1998).

O resultado obtido foi surpreendente e a prevalência encontrada foi de 52,8% com uma melhoria significativa da qualidade das bandas. A utilização da *Platinum[®] Taq DNA polymerase High Fidelity* da INVITROGEN *Life Technologies* apresentou-se muito eficaz e importante para esclarecimento diagnóstico destas pacientes. Barlow et al. (2001) relatam que em pacientes crônicos o número de cópias da bactéria na cérvix uterina diminui e este pode ser um fator limitante no diagnóstico. Neste momento o ideal seria coletarmos material proveniente da tuba uterina, que segundo Barlow et al. (2001) relatam possuir maior número de cópias da bactéria e, portanto mais adequado para avaliação diagnóstica. Esta coleta não foi realizada neste estudo devido a fatos que para obtenção deste tipo de amostra implicariam em procedimentos médicos de maior complexidade não previstos para este projeto. Porém, fica claro a necessidade deste estudo em projetos de pesquisa posteriores.

Os resultados mostraram claramente ao usar a enzima do sistema da *Taq DNA Polimerase Labtrade* do Brasil baixo rendimento ao detectar amostras com provável baixo número de cópias da bactéria na cérvix uterina. Uma das desvantagens desta enzima é a baixa fidelidade na replicação por não ter a atividade da exonuclease 3' 5' (LGC BIOTECNOLOGIA [1998?]). Desta forma pode ocorrer uma má combinação acidental do iniciador no fragmento de DNA e conseqüentemente produzir erros na replicação.

Devido este fato podemos enfatizar a importância na utilização da *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity*, pois, além de ser uma enzima que possui especificidade e fidelidade 6 vezes maior em relação a *Taq* polimerase comum, possui atividade de exonuclease 3' 5' e permite também a amplificação de fragmentos menores (HU et al., 2003; INVITROGEN LIFE TECHNOLOGIES, 2003).

Talvez este seja um ponto crucial na abordagem clínica e diagnóstica destas pacientes.

A decisão pela utilização de outra enzima, ou seja, *Platinum[®] Taq DNA polymerase High Fidelity*, teve grande importância para conclusão deste trabalho.

6.2. Análise da prevalência e condições – sócio econômicas e demográficas da população do estudo

Neste estudo analisaram-se 106 mulheres com problemas de infertilidade que buscaram atendimento na clínica de infertilidade do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes e verificou-se uma prevalência bastante elevada de 52,8%. Um estudo realizado por Barlow et al. (2001) também com um grupo de mulheres que apresentavam infertilidade por fator tubário, detectou-se uma prevalência de 71% de DNA clamidial pelo método de diagnóstico de PCR utilizando iniciadores T1 e T2 que amplificam um fragmento de 7,5-kb do DNA plasmidial da *C. trachomatis* e enzima *Taq DNA polymerase* 1 U. As estimativas do CDC, nos EUA, mostram que a infecção pela *C. trachomatis* está amplamente disseminada e que existem mais casos novos desta doença do que qualquer outra DST (PASSOS; VARELLA e MIRANDA, 2003). De acordo com Miranda; Gadelha e Passos (2003), no Brasil não há muitos dados que demonstrem a situação da infecção pela *C. trachomatis*. Os dados publicados em diversas literaturas sobre a prevalência de infecção por clamídia são estudos isolados, em populações específicas e em determinados serviços (MIRANDA; GADELHA e PASSOS, 2003). Atualmente há poucos estudos com relação à prevalência de *C. trachomatis* em Manaus e nenhum trabalho realizado anteriormente associando a clamídia com a infertilidade feminina. Os trabalhos que já foram realizados com clamídia em mulheres sexualmente ativas na cidade de Manaus foram do Alencar; Ferreira e Loureiro (1993), Santos et al. (2003) e Alfaia (2005), sendo que o método de diagnóstico de escolha foi a imunofluorescência indireta no primeiro e PCR no segundo e terceiro estudo. Vários métodos são usados para diagnosticar *C. trachomatis*, mas estudos apontam que o método de PCR é mais sensível e específico.

Analisando as variáveis sócio-econômicas e demográficas em relação ao resultado da PCR para *C. trachomatis*, verificou-se que a faixa etária de mulheres com diagnóstico de infertilidade e positivas para clamídia foi > 30 anos (51,8%), apresentando, portanto uma

média de idade com DP $32,0 \pm 4,9$. Através desta análise observou-se que não houve significância estatística e a mediana de idade das pacientes é de 31,0 anos. Embora, maioria dos estudos preconiza que a alta prevalência da infecção por clamídia encontra-se em jovens com faixa etária < 25 anos, segundo Land et al. (2002), maioria das pacientes que apresentam problemas de infertilidade possui idade > 25 anos. Como uma das causas de infertilidade decorre da infecção crônica por *C. trachomatis*, supõe-se que a faixa etária que apresenta infertilidade seja uma faixa etária mais elevada.

A maioria das mulheres que apresentaram resultado positivo para clamídia declarou ter união estável (87,5%) e 44,6% tinham completado o ensino médio. Embora a maioria das mulheres tenha declarado união estável e ensino médio completo, provavelmente a alta prevalência (52,8%) encontrada neste estudo esteja relacionada com número de parceiros sexuais (27) (48,2%) que já tiveram contato. Gaydos et al. (1991) revelaram que o parceiro sexual masculino é um importante reservatório para as infecções que ocorrem no sexo feminino.

Observou-se também que a renda familiar da maioria das participantes positivas para clamídia encontrava-se entre dois a quatro salários mínimos (33,9%) e maioria delas (28,6%) declarou ter residência na região zona leste da cidade de Manaus. Apesar de que não houve significância estatística em relação à zona residencial das participantes e associação com a positividade dos exames para clamídia, o baixo nível econômico dessas participantes teve significância estatística ($p > 0,0274$). Independentemente do grau de escolaridade e maioria delas ter união estável com seus parceiros, ficou destacado que o baixo nível de renda das pessoas ainda é um fator importante para altas taxas de DST. Segundo Miranda; Gadelha e Passos (2003), maioria das vezes a subordinação econômica e sociocultural da mulher faz com que elas tenham poucos recursos para controlar sua exposição às DST dificultando, portanto, a exigência de um comportamento sexual seguro de seu parceiro. Quanto ao dado de que a maioria das pacientes declarou moradia na zona leste, isto deve-se ao fato da localização geográfica do Hospital Dona. Francisca Mendes, que também pertence a zona leste. Segundo Nascimento e Teixeira (2006), a zona leste caracteriza-se por ocupações de áreas não construídas (invasões) e constitui-se a área mais pobre da cidade em termos de padrões sócio-econômicos.

Neste estudo observou-se que a distribuição de gravidez ectópica nas mulheres com diagnóstico de infertilidade foi alta (5,4%) no universo estudado de 106 mulheres.

Entretanto, do total de 106 pacientes analisadas neste estudo 4 relataram episódio de gravidez ectópica. Destas quatro (4), três (3) foram positivas para *C. trachomatis*, ou seja, 75% das pacientes com gravidez ectópica foram positivas para *C. trachomatis*. Assim, podemos inferir a relevância da patologia por *C. trachomatis* assim como a importância do seu diagnóstico precoce. Segundo Bouyer et al. (2003); Marchbanks e Aneger (1988), existem vários fatores que se associam ao aumento de risco para gravidez ectópica durante a vida reprodutiva. De acordo com Fernandes et al. (2004), o conseqüente dano parcial ou completo das trompas de Falópio permite que essas mulheres, no futuro, vivenciem como seqüela gravidez ectópica. Beslagic; Jasminka e Mahmutovic (2004) relataram que a DIP é uma doença de etiologia polimicrobiana e a participação da clamídia está associada como um dos agentes responsáveis pela infecção causando a gravidez ectópica.

Embora sem significância estatística, 14,3% das pacientes apresentaram dados clínicos de cervicite. Esta informação apresenta uma importante informação para a saúde reprodutiva da mulher, pois, em diversas situações podem evoluir para seqüelas como DIP ou infecções na gravidez, podendo levar a parto prematuros e infecções neo-natais. Num estudo realizado por Harrison's (2002), o resultado da incidência de cervicite foi de aproximadamente 5% entre estudantes universitárias assintomáticas e mais de 10% em mulheres que buscaram atendimento em clínicas especializadas de planejamento familiar. Esse achado clínico está de acordo com a abordagem sindrômica de corrimento vaginal e cervicite constatado no Ministério da Saúde (2006). Embora no total das 56 mulheres positivas, 48 pacientes (85,7%) não apresentavam sinais de cervicite. De acordo com Carvalho; Angeli e Kraiden (2004); Land e Evers (2002), este fato torna-se relevante principalmente pelo caráter assintomático que esta infecção apresenta e assim pela dificuldade de seu rastreamento. As cervicites podem evoluir para seqüelas importantes como doença inflamatória pélvica, tendo como conseqüências: infertilidade, gravidez ectópica, aborto e trabalho de parto prematuro.

O resultado deste trabalho com relação ao aborto e infecção por clamídia foi que 28,6% das mulheres positivas para *C. trachomatis* relataram aborto, enquanto que 71,4% das mulheres com diagnóstico positivo para *C. trachomatis* não relataram ter passado pelo o processo de aborto. Alguns estudos demonstram a relação do aborto e infecção clamidial. Penney et al. (1998) relataram que amostras coletadas do trato genital inferior tem mostrado a presença de clamídia em 6% das mulheres em fase de indução ao abortamento. Porém se

avaliarmos o universo de 27 mulheres que relataram episódio de abortamento, verificou-se que 16 (59,2%) foram positivas para *C. trachomatis*. Portanto, verificou-se que em torno de 60% dos abortos relatados há presença de *C. trachomatis*, havendo a necessidade de esclarecer sobre o verdadeiro papel da *C. trachomatis* na patogênese do aborto. Segundo Mardh (2002), mulheres grávidas com a infecção por *C. trachomatis* pode resultar em aborto espontâneo no 1º trimestre de gravidez.

De acordo com a pesquisa realizada, 31 (54,4%) mulheres que apresentavam infertilidade primária e 25 (44,6%), infertilidade secundária tinham resultado positivo para clamídia. Segundo Wiesenfeld (2002), as complicações mais temíveis são a salpingite e a doença inflamatória pélvica que pode ocasionar esterilidade definitiva tanto na infertilidade primária quanto na infertilidade secundária. Um estudo realizado na Holanda por Hartog (2004) descreve que a presença mínima de lesões tubárias ou endometrite assintomática compromete a fertilidade, mesmo que seus achados laparoscópicos se mostrem normais. Embora boa parte das participantes do estudo possui prognóstico de infertilidade, não podemos afirmar que este fato estaria relacionado com presença de possíveis lesões tubárias.

Devido ao tempo do estudo no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes ter sido feito em curto espaço de tempo, não foi possível obter resultados do exame de histerossalpingografia (HSG) de todas as pacientes. A HSG é um exame que permite avaliar a permeabilidade tubária e a cavidade uterina na investigação de causa tanto de infertilidade primária como secundária.

Sabendo que o uso indiscriminado de antibióticos pode gerar uma resistência bacteriana, questionamos as pacientes quanto ao uso de antibióticos e obtivemos o seguinte resultado: 18 pacientes (32,1%) de 56 com diagnóstico positivo para clamídia tomaram antibiótico para diversas finalidades neste último ano. Land et al. (2002), verificaram que não há diferença na detecção de *C. trachomatis* em pacientes que fizeram uso de antibióticos para tratamentos (tetraciclina, ofloxacino ou roxitromicina) e em pacientes que não fizeram uso. Alguns estudos indicam que *C. trachomatis* poderá persistir num estado viável nas trompas de Falópio por um longo período, mesmo após tratamento com antibióticos. Chernesky (1999), através de alguns estudos, verificou através do teste de ácido nucléico, o resultado para infecção clamidial pode permanecer positiva semanas mesmo após tratamentos.

Segundo Paavonen e Eggert-Kruse (1999), nesses casos se a *C. trachomatis* persistir em não responder a ação de antibióticos, essa informação poderá influenciar na decisão de um novo direcionamento clínico de infecções por clamídia no futuro.

Embora é sugerido que a realização de tratamento inicial para infecção clamidial é um sucesso, o antibioticoterapia durante a fase crônica da infecção poderá ser menos efetivo (PAAVONEN e EGGERT-KRUSE, 1999).

6.3. Análise de amostras com bandas fracas

Quando se analisou o gel de agarose 2% verificou-se que algumas bandas correspondentes ao DNA plasmidial da *C. trachomatis* apresentavam-se fracas causando dúvidas para o diagnóstico. Para elucidar este problema foi feito um gel de poliacrilamida 6%, onde se confirmou a existência das mesmas.

Provavelmente, as amostras com bandas fracas representaram baixo número de cópias do DNA bacteriano. A *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* são as causas mais comuns de DIP e segundo Westrom e Mardh (1990), a coinfeção entre esses dois microrganismos também ocorrem frequentemente. Alguns estudos relatam que *C. trachomatis* pode causar inicialmente uma infecção endocervical e depois ascender ao trato genital superior persistir e permanecer num estado metabolicamente ativo por um longo período de tempo resultando uma PCR negativa da cérvix (DIETERLE et al., 1998; GÉRARD et al., 1998; RICE e SCHACHTER, 1991).

6.4. Estudo de variabilidade genética dos fragmentos amplificados

As 10 (dez) seqüências de DNA obtidas correspondentes ao DNA plasmidial de *C. trachomatis* foram analisadas no programa BLAST (disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov) e comparou-se as seqüências obtidas com as seqüências do plasmídio de *C. trachomatis* depositadas no *Gene Bank* e observou-se que o sítio de *Hind III* permaneceu preservado em todas as amostras seqüenciadas.

Ao avaliar-se as seqüências do DNA plasmidial de *C. trachomatis* correspondentes a 180 pb obtidas por sequenciamento verificou-se algumas mutações que variaram de 1,1% a 3,3%, as quais não implicam em mudanças genéticas importantes e que podem ter ocorrido devido a limitações da técnica.

7. CONCLUSÃO

- A prevalência encontrada de *Chlamydia trachomatis* em mulheres com diagnóstico de infertilidade atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes foi de 52,8% utilizando-se a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity*.
- Das 106 amostras clínicas que foram analisadas por PCR utilizando os iniciadores KL1 e KL2 e a enzima *Taq DNA polimerase recombinante da LABTRADE* do Brasil Ltda., detectou-se apenas 5,7% (6 amostras) de positividade.
- Conforme o observado, a *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity* mostrou-se bem mais eficiente para utilização em diagnóstico molecular para *Chlamydia trachomatis*.
- A média de idade das mulheres que participaram deste estudo e positivas para clamídia foi de 32 anos. Isso demonstra a procura tardia para tratamento da infertilidade. Um fator importante para este comportamento é a existência de 70 a 80,0% de mulheres assintomáticas.
- Apesar de que maioria das mulheres estudadas declarou ter união estável com seus parceiros, 87,5% delas foram diagnosticadas positivamente para clamídia, onde 48,2% das mulheres com PCR positivo para *Chlamydia trachomatis* relataram três ou mais parceiros sexuais durante a vida.
- Neste estudo, observou-se que grande parte das pacientes infectadas por clamídia possui uma renda familiar baixa (33,9%) e reside em bairros de nível sócio-econômico baixo (28,6%).

- 48,2% das pacientes positivas para clamídia referiam três ou mais parceiros sexuais durante toda a vida e 55,4% apresentaram infertilidade primária.
- Do total de 106 pacientes analisadas neste estudo 4 relataram episódio de gravidez ectópica. Destas quatro (4), três (3) foram positivas para *Chlamydia trachomatis*, ou seja, 75% das pacientes com gravidez ectópica foram positivas para *Chlamydia trachomatis*. Assim, podemos inferir a relevância da patologia por *Chlamydia trachomatis* assim como a importância do seu diagnóstico precoce.
- No universo de 27 mulheres que relataram episódio de abortamento, verificou-se que 16 (59,2%) foram positivas para *Chlamydia trachomatis*. Portanto, verificou-se que em aproximadamente 60% dos abortos relatados houveram a presença de *Chlamydia trachomatis*, havendo a necessidade de esclarecer sobre o verdadeiro papel da *Chlamydia trachomatis* na patogênese do aborto.
- No total das 106 mulheres estudadas, 48 pacientes (85,7%) com diagnóstico positivo para *Chlamydia trachomatis* não apresentavam sinais de cervicite. Este fato torna-se relevante principalmente pelo caráter assintomático que esta infecção apresenta e assim pela dificuldade de seu rastreamento.
- No presente estudo, verificou-se baixa variabilidade genética nas amostras seqüenciadas de *Chlamydia trachomatis*.
- Uma vez que a assintomatologia e a taxa de prevalência encontrada neste trabalho foi alta (85,7%) e (52,8%), recomenda-se fazer uma investigação rotineira para *Chlamydia trachomatis* em mulheres sexualmente ativas através da técnica da PCR por ser um método que demonstra melhor sensibilidade e especificidade para o diagnóstico desta infecção.

8 . REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMASSIH, R. Infertilidade – Fator Tubário e Peritonal 2. **Coletânea Infertilidade**. Disponível em: <<http://www.arstechnica.com.br/abdelmassih/noticias/noticia3.php>>. Acesso em: 08 mar. 2006.

ABDELMASSIH, V. Médico diz que a clonagem humana já está ultrapassada. **Jornal Correio da Paraíba**, Notícias da Clínica, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.arstechnica.com.br/abdelmassih/noticias/noticia3.php>>. Acesso em: 08 mar. 2006.

ADLER, M.W. Sexual health-health of the nation. **Sex. Transm. Dis.**, v. 79, p. 84-85, 2003.

AGHANWA, H.S.; DARE, F.O.; OGUNNIYI, S.O. Sociodemographic factors in mental disorders associated with infertility in Nigeria. **J Psychosom Res.**, v. 46, n.2, p. 117-23, 1999.

AKANDA, V. Chlamydia serology screens for tubal damage. **Human Reproduction.**, v. 18, p. 1841-7, 2003. In: MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 1, n. 17, p. 66-70, 2005.

ALENCAR, A.A.F.; FERREIRA, L.C.L.; LOUREIRO, J.A.S. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por imunofluorescência direta em esfregaços endocervicais. **Jornal Brasileiro de Ginecologia.**, v. 103, n.6, p.199–203, 1993.

ALFAIA, A.P.B.B. Infecção por *Chlamydia trachomatis* em gestantes: Prevalência e Importância Pré-natal. 2005. **Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical)** – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM.

ALLAN, I.; PEARCE, J .H. Aminoacid requirements of strains *Chlamydia trachomatis* and *C. psittaci* growing in McCoy cells: Relationship with clinical syndrome and host origin. **J. Gen. Microbiol.**, v. 129, p. 2001-2007, 1983.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. Optimal evaluation of the infertile female. A committee opinion. <http://www.asrm.org> 2000. In: HUBACHER, D.; GRIMES, D.; LARA-RICALDE, R.; DE LARA JARA, J.; GARCIA-LUNA, A. The limited clinical usefulness of taking a history in the evaluation of women with tubal factor infertility. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 1, p. 6-10, 2004.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **DYEnamic ET DYE Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems**, United States, 2002.

ANTILA, T.; SAIKKU, P.; KOSKELA, P.; BLOIGU, A.; DILLNER, J.; et al. Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and Risk for Development of Cervical Squamous Cell Carcinoma. **JAMA**, v. 285, p. 47-51, 2001.

BARACAT, E.C.; LIMA, G.R. **Guia de medicina ambulatorial e hospitalar de ginecologia**. São Paulo: Manole, 2005. 698 p.

BARLOW, R.E.L.; COOKE, I.D.; ODUKOYA, OL.; HEATLEY, M.K.; JENKINS, J.; NARAYANSINGH, G.; RAMSEWAK, S.S.; ELEY, A. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* in fresh tissue specimens from patients with ectopic pregnancy or tubal factor infertility as determined by PCR and in-situ hybridisation. **J. Med. Microbiol.**, v. 50, p. 902-908, 2001.

BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. In: Applications – **Viral Pathogens**, p. 407-413, 1998.

BESLAGIC, E.; JASMINKA, G.; MAHMUTOVIC, S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in cervical smear samples with determined HPV. **Med. Arth.**, v. 3, n. 58, p. 143-4, 2004. In: MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J bras Doenças Sex Transm.**, v. 1, n. 17, p. 66-70, 2005.

BIRO, F. Adolescents and sexually transmitted diseases. **Maternal and Child Health Technical Information Bulletin**. Washington, DC; National Center for Education in Maternal and Child Health in Cooperation with the Maternal and Child Health Bureau Health Resources and Services Administration, Public Health Service, US Department of Health and Human Services. 1992.

BLACK, M.C. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Clin. Microbiol. rev.**, v.10, n.1, p.160-84, 1997. In: SEADI, C.F.; ORAVEC, R.; POSER B.V.; CANTARELLI, V.V. ; ROSSETTI, M.L. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n.2, p.125-133, 2002.

BLACK, M.C. et al. A. The use of molecular techniques for the diagnosis and epidemiologic study of sexually transmitted infections. **Cur. Infect. Dis. Rep.**, v.2, p.31-43, 2000.

BORGES, L.S.; SILVA, J.C.R.; SILVA, A.C.J.S.R.; AGUIAR, F.M.; NETO, O.B.P.; REIS, F.J.C.; NOQUEIRA, A.A. Avaliação da concordância diagnóstica entre métodos não invasivos e endoscopia na investigação de infertilidade. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, v. 27, n.7, p. 401–406, 2005.

BOUYER, J. COSTE, J. SHOJAEI, T. POULY, J.L. FERNANDEZ, H. GERBAUD, L. et al. Risk factors for ectopic pregnancy: a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in France. **Am J Epidemiol.**, v.157, p. 185-94. 2003. In: FERNANDES, A.M.S.; RIBEIRO, L.P.; MORAES, F.H.; MEIRA, P.C.; SOLLERO, C.A.; YAMADA, E.M. Prevalência de Gestação Ectópica de Tratamento cirúrgico em Hospital Público de 1995-2000. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 50, n. 4, p. 413-6, 2004.

BRUNHAM, R.C.; REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p.149-161, 2005.

BRUNHAM, R.C. et al. Etiology and outcome of acute pelvic inflammatory disease. **J. Infect. Dis.**, v. 158, p. 510-517, 1988. In: Immunology of Chlamydia Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p.149-161, 2005.

BRUNHAM, R.C.; PEELING, R.; MACLEAN, I.; MCDOWELL, J.; PERSSON, K.; OSSER, S. Postabortal *Chlamydia trachomatis* salpingitis: correlating risk with antigen-specific serological responses and with neutralization. **J. Infect Dis.**, v. 155, p. 749-55, 1987. In: **CDC WONDER. Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID)**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Prevention Services, v.40, 1991.

CALIENDO, A.M.M.D. Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection using amplification methods: can we afford it? **Clin. Microbiol. News**, v.20, n.9, p.75-8, 1998.

CARVALHO, N.S.; ANGELI, R.; KRAJDEN, M. Prevalência dos agentes de cervicite: Análise da Literatura. **DST – J bras Doenças Sex Transm.**, v. 16, n. 4, p. 56-60, 2004.

CATANHO, M. Desenvolvimento de Abordagens Computacionais e Ferramentas para a Análise Comparativa de Genomas Microbianos. 2005. **Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)** – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CATES, W; ROLFS, R.T.; ARAL, S.O. Sexually transmitted disease, pelvic inflammatory disease, and infertility: an epidemiologic update. **Epidemiol Rev.**, v. 12, p. 199-220, 1990. In: **CDC WONDER. Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID)**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Prevention Services. v.40, 1991.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trends in Reportable Sexually Transmitted Diseases in the United States, 2005. **National Surveillance Data for Chlamydia, Gonorrhea, and Syphilis**, December, 2006.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Trends in Reportable Sexually Transmitted Diseases in the United States, 2003 – **National Data on Chlamydia, Gonorrhea and Syphilis, 2003**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/std/stats/trends2003.htm>> Acesso em: 28 Mar. 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually transmitted diseases clinical practice guidelines. Atlanta Ga.: **Centers for Disease Control and Prevention**, 1991. In: SEADI C.F. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38. n 2. p.125-133, 2002.

CHERNESKY, M.A. Nucleic acid tests for the diagnosis of sexually transmitted disease. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v. 24. p. 437-446, 1999. In: AWWAD, Z.M.; AL-AMARAT, A.A.; SHEHABI, A.A. Prevalence of genital chlamydial infection in symptomatic and asymptomatic Jordanian patients. **Int J Infect Dis.**, v. 7. p. 206-209, 2003.

COHEN, C.R.; BRUNHAM, R.C. Pathogenesis of *Chlamydia* induced pelvic inflammatory disease. **Sex. Transm. Infect.**, v. 75, p. 21-24, 1999. In: Immunology of Chlamydia Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p.149-161, 2005.

COORDENAÇÃO NACIONAL DE DST/AIDS. **Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis DST.** 3.ed. 1999.

COTTER, T.W.; MENG, Q.; SHEN, Z.; ZHANG, Y.; SU, H.; CALDWELL, H. Protective Efficacy of Major Outer Membrane Protein-Specific Immunoglobulin A (IgA) and IgG monoclonal antibodies in a murine model of *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. **Infect. Immun.**, v.63, n.12, p. 4704-4714, 1995.

CROSBY, R.; SALAZAR, L.F.; DICLEMENTE, R.J.; YARBER, W.L.; CALIENDO, A.M.; STAPLES-HORNE, M. Health Risk Factors Among Detained Adolescents Females. *American Journal of Preventive Medicine*. **Elsevier**, v.27, n. 5, 2004.

DAAR, A.S.; MERALI, Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. [s.l.], [s.d.]. Disponível em: <<http://www.who.int/reproductive-health/infertility/5.pdf>> Acesso em: 22 jan. 2007.

DAILARD, C. HPV in the United States and Developing Nations: A problem of Public Health or Politics?. **The Guttmacher Report Report on Public Policy**, Aug., 2003.

De la MAZA, L.M.; PETERSON, E.M. Scanning electron microscopy of McCoy cells infected with *Chlamydia trachomatis*. **Exp. Mol. Pathol.**, v.36, p.217-226, 1982.

DEBATTISTA, J. et al. Immunopathogenesis of *Chlamydia trachomatis* infections in women. **Fertil. Steril.**, n. 79, p. 1273-1287, 2003.

DIAGNÓSTICOS DA AMÉRICA. **Índices de Exames Apoio Diagnóstico.** Disponível em: <[http://www.rrhh.bumeran.com.br/aplicantes/tercizacion/empresas/diagnosticosda_america / home.ngnf](http://www.rrhh.bumeran.com.br/aplicantes/tercizacion/empresas/diagnosticosda_america/home.ngnf)>. Acesso em: 20 abril. 2005.

DIETERLE, S.; RUMMEL, C.; BADER, L.W.; PETERSON, H.; FENNER, T. Presence of the mayor outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in patients with chronic salpingitis and salpingitis isthmica nodosa with tubal occlusion. **Fertility and Sterility**, n. 70. p. 774-776, 1998. In: LAND, J.A.; EVERS, J.L.H. Chlamydia infection and subfertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 901-912, 2002.

DIETERLE, S.; RUMMEL, C.; BADER, L.W.; PETERSON, H.; FENNER, T. Presence of the mayor outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* in patients with chronic salpingitis and salpingitis isthmica nodosa with tubal occlusion. **Fertil. Steril.**, n. 70. p. 774-776, 1998. In: LAND, J.A.; GIJSEN, A.P.; EVERS, J.L.H.; BRUGGEMAN, C.A. Chlamydia trachomatis in subfertile women undergoing uterine instrumentation. Screen or treat? **Human Reproduction**, v.17, n. 3, p. 525-527, 2002.

DINIZ, E.M.A; RAMOS, S.R.T.S.; VAZ, F.A.C. Transmissão vertical das doenças sexualmente transmissíveis. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 31, p. 188-202, 1985. In: XIMENES, A.C.; FERNANDEZ, R.N.; SILVA, N.A. Artrite reativa induzida por *Chlamydia trachomatis*: análises clínicas, laboratoriais e terapêuticas. **Rev Bras Reumatol.**, v. 36, n. 6, p. 359-366, 1996.

DOBSON, H.; SMITH, R.F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Anim Reprod Sci.**, v. 61, p. 743-52, 2000.

DONG, Z.W.; LI, Y.; ZHANG, L.Y.; LIU, R.M. Detection of *Chlamydia trachomatis* Intrauterine Infecion Using Polymerase Chain Reaction on Chorionic Villi. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 61, p. 29-32, 1998.

EGGER, M.L.; LOW, N.; DAVEY, S.G et al. Screening for chlamydial infections and the riskof ectopic pregnancy in a county in Sweden: ecological analysis. **British Medical Journal**, v. 316, p. 1776-1780, 1998. In: LAND, J. A.; EVERS, J.L.H. Chlamydia infection and subfertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 901-912, 2002.

ENG, T.R.; BUTLER, W.T. The hidden epidemic: confronting sexually transmitted diseases. Washington, D.C.: **National Academy Press**, p. 28-68, 1997. In: MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J Bras Doenças Sex Transm**, v. 1, n. 17, p. 66-70, 2005.

ESCHENBACH, D.A.; BUCHANAN, R.M. POLLOCK, H.M.; et al. Polymicrobial etiology of acute pelvic inflammatory disease. **N. Engl J Med**, v. 293. p. 166-71, 1975. In: CDC WONDER. Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, **National Center for Prevention Services**, v. 40, 1991.

Escova *cyto-brush* para coletas das amostras do endocérvice. FONTE: Retirado de <<http://www.clinilab.fr>>. Acesso em: 30 junho 2005.

ESPINOZA, L.R.; CABRERA, G.E.; SCOPELITIS, E.; CUELLAR, M.L.; CITERA, G.; SILVEIRA, L. Reactive arthritis: pathogenesis and clinical overview. **Rev Bras Reumatol.**, v. 33, p. 107-113, 1993. In: XIMENES, A.C.; FERNANDEZ, R.N.; SILVA, N.A. Artrite reativa induzida por *Chlamydia trachomatis*: análise clínica, laboratorial e terapêutica. **Rev Bras Reumatol.**, v. 36, n. 6, p. 359-366, 1996.

FERNANDES, A.M.S.; RIBEIRO, L.P.; MORAES, F.H.; MEIRA, P.C.; SOLLERO, C.A.; YAMADA, E.M. Prevalência de Gestação Ectópica de Tratamento cirúrgico em Hospital Público de 1995-2000. **Rev Assoc Med Bras**, v. 4, n. 50, p. 413-6, 2004.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3 ed. Brasília: **EMBRAPA-CENARGEN**, 1998. 220 p.

FRIAS, M.C.A.A.; PEREIRA, C.F.A.; PINHEIRO, V.M.S.; PINHEIRO, M.S.; ROCHA, C.F. Freqüência de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* na endocérvice de mulheres no menacme. **DST – J Bras Doenças Sex Transm**, v. 13. n. 3. p. 5-22, 2001.

FRIAS, M.C.A.A.; PEREIRA, C.F.A.; PINHEIRO, V.M.S.; PINHEIRO, M.S.; ROCHA, C.F. Freqüência de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* na endocérvice de mulheres no menacme. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 13. n. 3. p. 5-22, 2001. In: MARQUES, C. A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 17. n.1., p. 66-70, 2005.

GALVIN, S.R.; COHEN, M.S. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. **Nat Rev Microbiol.**, v. 2, p. 33-42, 2004.

GAYDOS, C.A; HOWELL, M.R.; PARE, B.; CLARK, K.L.; ELLIS, D.A. *Chlamydia trachomatis* infections in female military recruits. **N Engl J Med.**, v. 339, p. 739-744, 1991. In: MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 1, n. 17, p. 66-70, 2005.

GEORGE, J.A.; PANCHATCHARAM, T.S.; PARAMASIVAM, R. Evaluation of diagnostic efficacy of PCR methods for *Chlamydia trachomatis* infection in genital and urine specimens of symptomatic men and women in India. **Jnp J Infect Dis.** v. 56, p. 88-92, 2003.

GÉRARD, H.C.; BRANIGAN, P.J.; BALSARA, G.R. et al. Viability of *Chlamydia trachomatis* in fallopian tubes of patients with ectopic pregnancy. **Fertility and Sterility.**, v. 70, p. 945-948, 1998. In: LAND, J.A.; EVERS, J.L.H. Chlamydia infection and subfertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology.**, v. 16, n. 6, p. 901-912, 2002.

GERBASE, A.C.; ROWLEY, T.E.; MERTENS, T.E. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. **Lancet n. 351 (Suppl. III)**, p. S2-S4, 1998. In: PAAVONEN, J. Sexually transmitted chlamydial infections and subfertility. **International Congress Series**, n. 1266, p. 277-286, 2004.

GERRITY, D.A. A biopsychosocial theory of infertility. **Fam J.**, v. 9, p. 151-8, 2001. In: MOUREIRA, S.N.T.; LIMA, J. G.; SOUSA, M.B.C.; AZEVEDO, G.D. Estresse e função reprodutiva feminina. **Rev Bras Saúde Matern. Infant.**, v. 5, n.1, p. 119-125, 2005.

GLATT, A.E.; Mc CORMACK, W.M.; TAYLOR ROBINSON, D. Genital mycoplasmas. In: HOLMES, K.K., MARDH, P-A.; SPARLING, P.F.; WIESNER, P.J.; eds. Sexually transmitted diseases, 2nd ed. New York: McGraw-Hill Information Services. P. 279-93, 1990. In: **CDC WONDER. Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Prevention Services.** v.40, 1991.

GOTZ, H. et al. Is the increase in notifications of *Chlamydia trachomatis* infections in Sweden the result of changes in prevalence, sampling frequency or diagnostic methods? **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 34, p. 28-34, 2002. In: BRUNHAM, R.C. e REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* Infection: Implications for a *Chlamydia trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, p.149-161, 2005.

Gravidez ectópica. FONTE: Retirado de <<http://www.ultrasom3d.com>>. Acesso em: 20 novembro 2005.

GREGORY, W.W.; GARDNER, M.; BYRNE, G: Arrays of hemispheric surface projections on *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* observed by scanning electron microscopy. **Infect. Immun.**, v.138. p. 241-244, 1979.

GRIFFAIS R.; THIBON, M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by Polimerase Chain Reaction. **Res Microbiol.**, v. 140, p. 139-141, 1989.

GUASCHINO, S.; SETA, F. Update on *Chlamydia trachomatis*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 900, p. 293-300, 2000.

GUERRA, D.; LLOBERA, A.; VEIGA, A.; BARRI, P.N. Psychiatric morbidity in couples attending a fertility service. **Hum Reprod**, v. 13, p. 1733-36, 1988. In: MOUREIRA, S.N.T.; LIMA, J. G.; SOUSA, M.B.C.; AZEVEDO, G.D. Estresse e função reprodutiva feminina. **Rev Bras Saúde Matern. Infant.**, v. 5, n.1, p. 119-125, 2005.

HAGGERTY, C.L.; NESS, R.B.; AMORTEGUI, A.; HENDRIX, S.L.; HILLIER, S.L.; HOLLEY, R.L.; PEIPERT, J.; RANDALL, H.; SONDHEIMER, S.J.J.; SOPER, D.E.; SWEET, R.L.; TRUCCO, G. Endometritis does not predict reproductive morbidity after pelvic inflammatory disease. **Am J Obstet Gynecol.**, v. 188, n. 1, p. 141-148, 2003.

HALL, S.G. *Chlamydia trachomatis* update on laboratory diagnosis. Check sample. **Am. Soc. Clin. Pathol.**, v. 40, n. 4, p. 49-61, 1997.

HALLSWORTH, G.P. et al. Comparison of antigen detection, polymerase chain reaction and culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in genital infection. **Pathol.**, v.27, p.168-71, 1995.

HAMDAD, F.; ORFILA, J.; BOULANGER, J.C; et al. *Chlamydia trachomatis* urogenital infections in women. Best diagnosis approaches. **Gynecol Obstet Fertil.**, v. 32, p. 1064-74, 2004.

HANSEN, L.; WONG, T.; PERRIN, M. Gonorrhoea resurgence in Canada. **Int. J. STD AIDS**, n. 14, p. 727-731, 2003.

HARRISON'S. Principles of Internal Medicine. 15^a edição. McGraw-Hill Book Company. p. 759-766, 2002. In: CARVALHO, N.S.; ANGELI, R.; KRAJDEN, M. Prevalência dos Agentes de Cervicite: Análise da Literatura. *Prevalence of Cervicitis Agents: Literature Review*. **DST – J bras Doenças Sex Transm.**, v.4, p. 56-60, 2004.

HARRISON, H.R.; COSTIN, M.; MEDER, J.B. Cervical *Chlamydia trachomatis* infection in University Women: Relationship to history, contraception, ectopy and cervicitis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 153, n. 3, p. 244-251, 1985.

HARTOG, J. *Chlamydia pneumoniae* role in tubal pathology studied. **Human Reproduction**. N. 19, p. 1380-4, 2004. In: MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J bras Doenças Sex Transm.**, v. 1, n. 17, p. 66-70, 2005.

HU, E.B.; ZHENG, W.; STASSINOPOULOS, A; LEE, J.E. Increased specific amplification and flexibility of Accuprime™ *Taq DNA Polymerase High Fidelity* in PCR. **Focus**, v. 25.3, 2003.

HUBACHER, D.; LARA-RICALDE, R.; TAYLOR, DJ. Use of copper intrauterine devices and the risk of tubal infertility among nulligravid women. **N Engl J Med.**, v. 345, n.8, p. 561-7, 2001.

HUGHES, R.; KEAT, A. Reactive arthritis: the role of bacterial antigen in inflammatory arthritis. **Ballieres Clin Rheumatol.**, v. 6, p. 285-308, 1992. In: XIMENES, A.C.; FERNANDEZ, R.N.; SILVA, N.A. Artrite reativa induzida por *Chlamydia trachomatis*: análise clínica, laboratorial e terapêutica. **Rev Bras Reumatol.**, v. 36, n. 6, p. 359-366, 1996.

IBGE – Censos Demográficos e Contagem Populacional; para os anos intercensitários, estimativas preliminares dos totais populacionais, estratificadas por idade e sexo pelo MS/SE/Datasus. **População Residente por Sexo segundo Município. Microrregião: AM Manaus. Sexo: Feminino.** Período: 2006.

INVITROGEN LIFE TECNOLOGIES. *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity*. 2003.

ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R. O impacto da infecção por *Chlamydia* em populações indígenas da Amazônia brasileira. **Cad. Saúde Pública.**, v. 17, n. 2, p. 385-396, 2001.

JONES, R.B. Chlamydial diseases. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious disease**. 4th ed. New York, Curchill Livingstone, 1995. In: SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; SPARTACO, A.F. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, by PCR. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.7, n.2, p. 91-95, 2003.

KAMWENDO, F.F.L.; BODIN, L. et al. Epidemiology of ectopic pregnancy during a 28 year period and the role of pelvic inflammatory disease. **Sex Transm Infect.**, v. 76, n. 1, p. 28-32, 2000.

KELLOGG, J.A.; SEIPLE, J.W.; HICK, M.E. Cross-Reaction of Clinical Isolates of Bacteria and Yeasts with the Chlamydiazyme Test for Chlamydial Antigen, Before and After Use of Blocking Reagent. **AM J. Clin. Pathol.**, v. 97, n. 3, p. 309-312, 1992.

KELLOGG, N.D.; BAILLARGEON, J.; LUKEFAHR, J.L. Comparison of nucleid acid amplification tests and culture techniques in the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in victims of suspected child sexual abuse. **J Pediatr Adolesc Gynecol.**, v. 17, p. 331-339, 2004.

KHALAF, Y. Tubal subfertility. **BMJ**, v.327, p. 610-613, 2003.

KINNUNEN, A.; MOLANDER, P.; LAURILA, A. et al. *Chlamydia trachomatis* reactive T lymphocytes from upper genital tract tissue specimens. **Hum Reprod.**, v. 7, p. 1484-1489, 2000.

KINNUNEN, A.; MOLANDER, P.; MORRISON, R. et al. Chlamydial heat shock protein 60 specific T cells in inflamed salpingeal tissue. **Fertil Steril.**, v. 1, p. 162-166, 2002.

KINNUNEN, A.; PAAVONEN, J.; SURCEL, H.M. Heat shock protein 60 specific T-cell response in chlamydial infections. **Scand. J. Immunol.**, v. 54, 2001.

KOHL, P.K. Epidemiology of sexually transmitted disease. What does it tell us? **Sexually Transmitted Diseases**, v. 21, p. S81-S83, 1994. In: LAND, J. A.; EVERS, J.L.H. Chlamydia infection and subfertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 901-912, 2002.

KRITSKI, L.A. et al. Reação em cadeia da polimerase (RCP/PCR) aplicada ao diagnóstico de tuberculose. **J. Pneumol.**, v. 23, n.1, p.33-42, 1997.

KUIEN, T.H.; GLENNAS, A.; MELBY-KJETIL et al. Reactive arthritis: incidence, triggering agents and clinical presentation. **J. Rheumatol.**, v. 21, p. 115-122, 1994. In: XIMENES, A.C.; FERNANDEZ, R.N.; SILVA, N.A. Artrite reativa induzida por *Chlamydia trachomatis*: análise clínica, laboratorial e terapêutica. **Rev Bras Reumatol.**, v. 36, n. 6, p. 359-366, 1996.

LAND, J.A.; EVERS, J.L.H. Chlamydia infection and subfertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 901-912, 2002.

LAND, J.A.; GIJSEN, A.P.; EVERS, J.L.H.; BRUGGEMAN, C.A. Chlamydia trachomatis in subfertile women undergoing uterine instrumentation. Screen or treat? **Human Reproduction**, v.17, n. 3, p. 525-527, 2002.

LEWIN, B. Genes VI. Oxford New York Tokyo. **Oxford University Press**, p.122-125, 1997.

LGC BIOTECNOLOGIA. *Taq* DNA Polimerase recombinante. [1998?].

LÓPEZ-HURTADO, M.; GUERRA-INFANTE, F.M. Papel de los anticuerpos ver el desarrollo de la infección por *Chlamydia trachomatis* y su utilidade em el Diagnóstico. **Perinatol Reprod Hum.**, v. 16, n.3, p. 140-150, 2002.

MAHONY, J. B.; LUINSTRA, K. E.; SELLORS, J. W. et al. Comparison of Plasmid and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assays for detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1753-1758, 1993.

MANDELL, G.L.; DOUGLAS JR, G.R.; BEN, J.E. **Practice of infectious diseases**. 3rd ed. New York. Churchill Livingstone, 1990.

MARCHBANKS, P.A.; ANEGER, J.F. Risk factors for ectopic pregnancy: a population based study. **JAMA**, n.. 259. p. 1823-7, 1988. In: FERNANDES, A.M.S.; RIBEIRO, L.P.; MORAES, F.H.; MEIRA, P.C.; SOLLERO, C.A.; YAMADA, E.M. Prevalência de Gestação Ectópica de Tratamento cirúrgico em Hospital Público de 1995-2000. **Rev Assoc Med Bras**, v. 4, n. 50, p. 413-6, 2004.

MARDH, Per-Anders. Influence of infection with *Chlamydia trachomatis* on pregnancy outcome, infant health and life-long sequelae in infected offspring. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 847-864, 2002.

MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 1, n. 17, p. 66-70, 2005.

MICHELON, J.; BOENO, A.; CUNHA FILHO, E.V.; STEIBEL, G.; BERG, C.; TORRENS, M.C.T. Diagnóstico da infecção urogenital por *Chlamydia trachomatis*. **Scientia Medica**, v.15, n.2, p. 115-120, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sescrretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Plano Estratégico. **Programa Nacional de DST e AIDS**, Brasília, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Controle Doenças Sexualmente Transmissíveis DST**. 4 ed. Brasília: Série Manuais, 2006.

MIRANDA, A.E.B. Padrão de comportamento e prevalência da infecção pela *Chlamydia trachomatis* em adolescentes do sexo feminino residentes na região de Maruípe em Vitória, ES. 2003. 166 f. **Tese (Doutorado em Saúde Pública)** – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MIRANDA, A.E; GADELHA, A.M.J.; PASSOS, M.R.L. Impacto da Infecção pela *Chlamydia trachomatis* na Saúde Reprodutiva. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 15, n. 1, p. 53-58, 2003.

MMWR – MORBIDITY AND MORTALITY WEEKLY REPORT. **Chlamydia Screening Among Sexually Active Young Female Enrollees of Health Plans – United States, 1999-2001.** Centers for Diseases Control and Prevention, v.53, n. 42, p.983-985, Outubro de 2004.

MOLANO, M.; MEIJER, C.J.L.M.; SERVAAS, A.M.; POL, R.; BRULE, A.J.C. Combination of PCR Targeting the VD2 of omp1 and Reverse Line Blot Analysis for typing of Urogenital *Chlamydia trachomatis* Serovars in Cervical Scrape Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 7, p. 2935-2939, 2004.

MOULDER, J. W. Looking at chlamydiae without looking at their hosts. **Am. Soc. Microbiol News**, v.50, p. 353-362, 1984.

MOUREIRA, S.N.T.; LIMA, J. G.; SOUSA, M.B.C.; AZEVEDO, G.D. Estresse e função reprodutiva feminina. **Rev Bras Saúde Matern. Infant.**, v. 5, n.1, p. 119-125, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 776 p.

NASCIMENTO, A.G.O.; TEIXEIRA, P. Análise da mortalidade por homicídios no município de Manaus segundo sua evolução histórica e fatores sócio-econômicos, institucionais e espaciais de determinação. In: XV Encontro Nacional de Estudos Populacionais, 2006, Caxambu. **Anais do XV Encontro Nacional de Estudos Populacionais**, 2006.

NICOLL, A.; HAMERS, F.F. Are trends in HIV, gonorrhoea, and syphilis worsening in Western Europe? **BMJ**, n. 324. p. 1324-1327, 2002.

NIEUWENHUIS, R.F.; OSSEWAARDE, J.M; GOTZ, H.M.; DEES, J.; THIO, H.B.; THOMEER, H.G.; DEN HOLLANDER, J.C.; NEUMANN, MH.; VEN DER MEIJDEN, W.I. Resurgence of lymphogranuloma venereum in Western Europe: an outbreak of *Chlamydia trachomatis* serovar 12 proctitis in the Netherlands among men who have sex with men. **Clin Infect Dis.**, v. 7, n. 39, p. 996-1003, 2004.

NUNES, J. C. Longe do direito ao filho. **Correio Braziliense**. Brasília, 15 set. 2003.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Prevalence and incidence of selected curable Sexually Transmitted Infections: Overview and estimates. Geneva, November, 2001. 50 p. In: MIRANDA, A. E. B. Padrão de comportamento e prevalência da infecção pela *Chlamydia trachomatis* em adolescentes do sexo feminino residentes na região de Maruípe em Vitória, ES. 2003. 166 f. **Tese (Doutorado em Saúde Pública)** – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ORTIZ, L.; DEMICK, K.P.; PETERSON, J.W. et al. *Chlamydia trachomatis* Major outer Membrane Protein (MOMP) Epitopes that activate HLA Class II restricted T cells from infected humans. **The Journal of Immunology**, v. 157, p. 4554-4567, 1996.

PAAVONEN, J e LEHTINEN, M. Chlamydia pelvic inflammatory disease. **Human Reproduction Update**, p. 519-529, 1996. In: Chlamydia infection and subfertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 901-912, 2002.

PPAAVONEN, J.; EGGERT-KRUSE, W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 5, p. 433-447, 1999.

PPAAVONEN, J. Sexually transmitted chlamydial infections and subfertility. **International Congress Series**, v. 1266, p. 277-286, 2004.

PAPREEN, N. et al. Living with infertility: experiences among urban slum populations in Bangladesh. **Reproductive Health Matters**, v. 8, p. 33-44, 2000. In: DAAR, A.S.; MERALI, Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. [s.l.], [s.d.]. Disponível em: <<http://www.who.int/reproductive-health/infertility/5.pdf>> Acesso em: 22 jan. 2007.

PASSOS, M.R.L.; VARELLA, R.Q. e BRAVO, R.S. Em foco – **Quadro clínico das principais doenças causadas pela *Chlamydia trachomatis***. São Paulo: Ed. Phoenix, 2005. Disponível em: <<http://www.uff.br/dst/chlamydia2.pdf>>. Acesso em: 20 abril 2005.

PASSOS, M.R.L.; VARELLA, R.Q. e MIRANDA, A.E. Em foco – ***Chlamydia trachomatis*: A Epidemia Silenciosa**. São Paulo: Ed. Phoenix, 2005. Disponível em: <<http://www.uff.br/dst/Chlamydia1.pdf>>. Acesso em: 24 abril. 2005.

PASSOS, M.R.L.; VARELLA, R.Q. e MIRANDA, A.E. ***Chlamydia trachomatis*: A epidemia silenciosa. Separata**. Rio de Janeiro, Phoenix Produções Editoriais, 2003.

PEELING, R.W. et al. Antibody to chlamydial hsp60 predicts an increase risk for chlamydial pelvic inflammatory disease. **J. Infect. Dis.**, v. 175, n. 5, p. 1153-8, 1997.

PEIPERT, J.F. Clinical practice. Genital chlamydial infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 349, p. 2424-2430, 2003.

PENNEY, G.C.; THOMSON, M.; NORMAN, J. et al. A randomised comparison of strategies for reducing infective complications of induced abortion. **British Journal of obstetrics and Gynecology**, n. 105. p. 599-604, 1998. In: LAND, J.A.; EVERS, J.L.H. Chlamydia infection and subfertility. **Best Research Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 16, n. 6, p. 901-912, 2002.

PERSING, D. H. In vitro Nucleic Acids amplification techniques. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WRITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology**. Washington Mayo Foundation Rochester, 1993.

PLATT, R.; RICE, P.A.; Mc CORMACK, W.M. Risk of acquiring gonorrhoea and prevalence of abnormal adnexal findings among women recently exposed to gonorrhoea. **JAMA**, v. 250, p. 3205-9, 1983. In: CDC WONDER. **Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID)**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Prevention Services, v.40, 1991.

PN-DST/AIDS. DST em números 2003. In: **Ministério da Saúde**. Disponível em: http://www.aids.gov.br/final/inferior_nova.asp >. Acesso em: 22 jan.2007.

PONTES, I.M.; ÂNGELO, P. C. S.; ASTOLFI FILHO, S., Desenvolvimento de Novos Marcadores Microssatélites para Análise Genética em Humanos. A Amazônia na Era Genômica e Pós-Genômica. **Livro de Resumos do 4º Encontro de Genética do Amazonas**, p. 79, 2003.

POPULATION COUNCIL. Reproductive Tract Infections: An Introductory Overview. [**fact sheet series**], 2001. Disponível em: <http://www.popcouncil.org/pdfs/RTIfacsheetsRev.pdf>. Acesso em 1 de novembro de 2005.

PUOLAKKAINEN, M.; HILTUNEN-BACK, E.; REUNALA, T.; SUHONEN, S.; LÄHTEENMÄKI, P.; LEHTINEN, M.; PAAVONEN, J. Comparison of Performances of Two Commercially Available Tests, a PCR Assay and a Ligase Chain reaction Test, in detection of Urogenital *Chlamydia trachomatis* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1489-1493, 1998.

QUINN, T.C. et al. Epidemiologic and microbiologic correlates of *Chlamydia trachomatis* infection in sexual partnerships. **Jama**, v. 276, n.21, p.1737-42, 1996.

RAMSEY, K.H.; SODERBERG, S.F.; RANK, R.G. Resolution of Chlamydial genital infection in B-cell-deficient mice and immunity to reinfection. **Infect. Immun.**, v. 56. p. 1320-1325, 1988.

RHOTON-VLASAK, A. Infections and Infertility. **Elsevier Science**, v. 7, n. 5, p. 200-206, 2000.

RICE, P.A.; SCHACHTER, J. Pathogenesis of pelvic inflammatory disease caused by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: where should research efforts focus? In: **Joint Meeting of the Centers for Disease Control and National Institutes of Health about Pelvic Inflammatory Disease Prevention, Management, and Research in the 1990s**. Bethesda, Maryland. Sept. p. 4-5, 1990. In: CDC WONDER. **Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID)**. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Prevention Services, v. 40, 1991.

RICE, P.A.; SCHACHTER, J. Pathogenesis of pelvic inflammatory disease; what are the questions? **JAMA**, n.266. p. 2587-2593, 1991. In: COHEN, C.R. **Pelvic Inflammatory Disease. Current Treatment Options in Infectious Diseases**, n. 2. p. 7-13, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory Manual**. New York, 2ª Edição. Cold Spring Harbor Lab. USA, Apendix E: E.3, 1989.

SAMOFF, E.; KOUMANS, E.H.; MARKOWITZ, L. E.; STERNBERG, M.; SAWYER, D.S.; PAPP, J.R.; BLACK, C.M.; UNGER, E.R. Association of *Chlamydia trachomatis* with Persistence of High-Risk Types of Human Papillomavirus in a Cohort of Female Adolescents. **Am J Epidemiol.**, v. 162, n. 7, p. 668-675, 2005.

SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; SPARTACO, A.F. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, by PCR. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.2, n.7, p. 91-95, 2003.

SARDINHA, J.C.G. et al. **Plano Interinstitucional das DST e AIDS no Estado do Amazonas**. 1999.

SATO, H.; CHINEN, P.A.; MATTAR, A.; SARTORI, M.G.F.; GIRÃO, M.J.B.C. Doença Inflamatória Pélvica. In: BARACAT, E.C.; LIMA, G.R. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar de ginecologia**. São Paulo: Manole, 2005. 698 p.

SATO, H.; SPIRONELLI, I.G.; KESSELRING, F.; SARTORI, M.G.F.; GIRÃO, M.J.B.C. Doenças Sexualmente Transmissíveis. In: BARACAT, E.C.; LIMA, G.R. **Guias de medicina ambulatorial e hospitalar de ginecologia**. São Paulo: Manole, 2005. 698 p.

SCHACHTER, J.; STAMM, W.E. *Chlamydia*. In: Manual of clinical microbiology. 7.ed. Washington, D.C.: **ASM Press**., p.795-806, 1999.

SCHACHTER, J. DFA, EIA, PCR, LCR and other technologies: What tests should be used for diagnosis of Chlamydia infections? **Immunological Investigations**, v. 26, p. 157-61, 1997. In: SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; SPARTACO, A.F. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, by PCR. **The Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.7, n.2, p. 91-95, 2003.

SCHACHTER, J. In Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity (ed. Stephens, R.S.) p.139-169. American Society for Microbiology Press, Washington DC, 1999. In: BRUNHAM, R.C. & REY-LADINO, J. Immunology of *Chlamydia* Infection: Implications for a *Chlamydia Trachomatis* Vaccine. **Nature Reviews/Immunology**, v.5, 2005.

SCHUSTER, D.M. et al. **Focus**[®]. V. 20, n. 34, 1998. In: *Invitrogen Platinum*[®] *Taq DNA Polymerase High Fidelity*. Disponível em: <<http://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.printMultipleSKU&p>> Acesso em: 16 fev. 2007.

SCROFERNEKER, M.L. e POHLMANN, P. R. **Imunologia básica e aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1998. 578 p.

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

SEADI, C.F.; ORAVEC, R.; POSER, B.V.; CANTARELLI, V.V.; ROSSETTI, M.L. Aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase in House no Diagnóstico Laboratorial da Infecção por *C. trachomatis*. **DST – Jmi Doenças Sex Transm.**, v. 15, n. 4, p. 17-21, 2003.

SHELTON, J.D. Risk of clinical pelvic inflammatory disease attributable to na intrauterine device. **Lancet**, v. 357, p.443, 2001.

SIEPER, J.; BRAUN, J.; et al. Pathogenic role of Chlamydia, Yersinia and Borrelia in undifferentiated oligoarthritis. **J Rheumatol.**, v. 19, p. 1236-1242, 1992. In: XIMENES, A.C.; FERNANDEZ, R.N.; SILVA, N.A. Artrite reativa induzida por *Chlamydia trachomatis*: análise clínica, laboratorial e terapêutica. **Ver Bras Reumatol.**, v. 36, n. 6, p. 359-366, 1996.

SILVA FILHO, A. M.; LONGATTO FILHO, A. **Colo Uterino & Vagina. Processos Inflamatórios. Aspectos Histológicos, Citológicos e Colposcópicos.** Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 209 p.

SILVEIRA, L.H.; GUTIERREZ, T.; SCOPELITIS, E. CUELLAR, M.L. CITERA, G.; ESPINOZA, L.R. Chlamydia-induced reactive arthritis. **Rheum Dis Clin North Am.**, v. 19, p. 351-362, 1993. In: XIMENES, A.C.; FERNANDEZ, R.N.; SILVA, N.A. Artrite reativa induzida por *Chlamydia trachomatis*: análise clínica, laboratorial e terapêutica. **Ver Bras Reumatol.**, v. 36, n. 6, p. 359-366, 1996.

SOARES, J.M.J; NICOLAU, S.M; DE LIMA, G.R.; BARACAT, E.C. Abdome Agudo. In: BARACAT, E.C.; LIMA, G.R. **Guia de medicina ambulatorial e hospitalar de ginecologia.** São Paulo: Manole, 2005. 698 p.

STAMM, W.E.; GUINAN, M.E.; JOHNSON, C. et al. Effect of treatment regimens for *Neisseria gonorrhoeae* on simultaneous infection with *Chlamydia trachomatis*. **N Engl J Med.**, n. 310, p. 545-9, 1984. In: CDC WONDER. **Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID).** U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Prevention Services. v. 40, 1991.

STEPHENS, R.S.; KALMAN, S.; LAMMEL, C.; MARATHE, J.F.R.; MITCHELL, W.; OLINGER, L.; TATUSOV, R.L.; ZHAO, Q.; KOONIN, E.V.; DAVIS, R.W. Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*. **SCIENCE**, v. 282, 1998.

SWEET, R.L.; BLANKFORT-DOYLE, M.; ROBBIE, M.O.; SCHACTER, J. The occurrence of chlamydial and gonococcal salpingitis during the menstrual cycle. **JAMA**, v. 255, p. 2062-4, 1986. In: CDC WONDER. **Policy Guidelines for Prevention and Management of Pelvic Inflammatory Disease (PID).** U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Prevention Services, v.40, 1991.

TAYLOR, A. Subfertility. Extent of the problem. **BMJ**, v. 327, p. 434-436, 2003.

TEMPLETON, A. *Chlamydia* screening. Adolescent Sexual Health. **Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.** 12 December, 2002. In: MOENS, V.; BARUCH, G.; FEARON, P. Opportunistic screening for *Chlamydia* at a community based contraceptive service for young people. **BMJ**, v. 326. p. 1252-1255, 2003.

TOTH, M.; PATTON, D.L.; CAMPBELL, L.A.; et al. Detection of chlamydial antigenic material in ovarian, prostatic, ectopic pregnancy and semen samples of culture-negative subjects. **Am J Reprod Immunol.**, v. 43, n. 4, p. 218-222, 2000.

TOYE, B. et al. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, n.8, p.2356-58, 1998.

UNISA, S. Childlessness in Andhra Pradesh, India: treatment-seeking and consequences. **Reproductive Health Matters**, v. 7, p. 54-64, 1999. In: DAAR, A.S.; MERALI, Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. [s.l.], [s.d.]. Disponível em: <http://www.who.int/reproductive-health/infertility/5.pdf> Acesso em: 22 jan. 2007.

VAN BALEN, F.; VERDURMEN, J.E.E.; KETTING, E. Age, the desire to have a child and cumulative pregnancy rate. **Hum. Reprod.**, v. 12, n. 3, p. 623-7, 1997.

UNITED NATIONS. World population monitoring 1996: Selected aspects of reproductive rights and reproductive health. New York: UN population Division, 1998. In: **WHO Regional Office for South-East Asia. Women's Health In South – East Asia**, Jan. 2002.

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

WEINSTOCK, H.M.D. et al. *Chlamydia trachomatis* infections. In: Sexually transmitted diseases in the Aidas era: part II. **Infect. Dis. Clin.**, n. Am. v. 8, n. 4, p. 797-819, 1994.

WEINSTOCK, H. et al. Sexually transmitted diseases among American youth: Incidence and prevalence estimates, 2000. Perspectives on Sexual and Reproductive Health. V. 36, n. 1, p. 6-10, 2004. In: Trends in Reportable Sexually Transmitted Disease in the United States, 2005. **National Surveillance Data for Chlamydia, Gonorrhoea and Syphilis**, 2006.

WESTROM, L.; MARDH, P.A. Acute pelvic inflammatory disease. In Sexually Transmitted Diseases. Edited by Holmes KK, Mardh PA, Sparling PF, Wiesner PJ. New York: McGraw-Hill. P. 593-623, 1990. In: COHEN, C.R. Pelvic Inflammatory Disease. **Current Treatment Options in Infectious Diseases**, n. 2. p. 7-13, 2000.

WHO Regional Office for South-East Asia. Women's Health In South-East Asia. Jan. 2002.

WIESENFELD, H. Lower Genital Tract Infection May Indicate Subclinical PID. **Obstetrics and Gynecology**, n. 100. p. 456-63, 2002. In: MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B. Infecção Genital por *Chlamydia trachomatis* e Esterilidade. **DST – J Bras Doenças Sex Transm.**, v. 1, n. 17, p. 66-70, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: Overview and Estimates. **World Health Organization**. Geneva, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Infertility: a tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility. Geneva: **WHO Programme on Maternal and Child Health and Family Planning**, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. STI HIV Sexually Transmitted Infections: Briefing Kit For Teachers. Regional Office for the Western Pacific, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. STI/HIV Status and trends of STI, HIV and AIDS at the end of the Millennium. Western Pacific Region, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: Global Program on AIDS: "Global Prevalence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimated". **WHO/GPA/STD.**, p. 1-26, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sexually Transmitted and Other reproductive tract infectious. A guide to essential practice, 2005.

WYRICK, P.B. *C. trachomatis*: infection strategies of the ultimate intracellular pathogen. **ASM News**, 68. p. 70-76, 2002.

XIMENES, A.C.; SILVA, N.A. Arthritis versus Chlamydia infection. **Rev Esp Rheum.**, v. 20, p. 161, 1993. In: XIMENES, A.C.; FERNANDEZ, R.N.; SILVA, N.A. Artrite reativa induzida por *Chlamydia trachomatis*: análise clínica, laboratorial e terapêutica. **Rev Bras Reumatol.**, v. 36, n. 6, p. 359-366, 1996.

YAO, M.W.M.; SCHUST, D.J. Infertilidade. In: BEREK, S. J. **Novak: Tratado de Ginecologia**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005. 1338 p.

9. OBRAS CONSULTADAS

ARANGO, H.G. Bioestatística Teórica e Computacional. ed. Guanabara Koogan, 2001.

BERQUÓ, E.S. Bioestatística. São Paulo: EPU, 1980.

EPI-INFO, Versão 3.3 for Windows, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças - CDC, Califórnia, janeiro de 1997.

VIEIRA, S. Bioestatística, Tópicos Avançados. Rio de Janeiro. 2.ed. – RJ: Elsevier, 2004.

10 . ANEXOS

Anexo A

Parecer Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM



PARECER CONSUBSTANCIADO

- I - **Identificação:**
- Título do Projeto de Pesquisa: "Detecção de *Clamýdia trachomatis* em amostras endocervicais de mulheres inférteis pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) na cidade de Manaus/Amazonas"
 - Pesquisadora Responsável: Norma Suely de Lima Freitas
 - Instituição onde se realizará: CAM/UFAM
 - Data de apresentação ao CEP: 05/7/05
 - Processo nº 131/05
- II - **Objetivos:**
- Investigar a presença de *Clamýdia trachomatis*, pela técnica de diagnóstico da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), em mulheres sexualmente ativas, atendidas com diagnóstico de infertilidade no Hospital Francisca Mendes na cidade de Manaus, visando estabelecer a incidência da infecção na população feminina estudada.
- III - **Sumário do Projeto:**
- A *Clamýdia trachomatis* é uma bactéria sexualmente transmissível, de grande impacto no sistema reprodutivo das mulheres, sendo também um importante problema para a Saúde Pública. O diagnóstico é crítico devido à frequência de infecções assintomáticas. Em mulheres, a infecção pela *C. trachomatis* causa doença inflamatória pélvica (DIP) e as suas conseqüências podem ser a infertilidade, gravidez ectópica e dor crônica pélvica. Este projeto pretende diagnosticar mulheres atendidas pela Clínica de Infertilidade do Hospital Francisca Mendes da UFAM, através da técnica de amplificação de ácidos nucleicos (PCR), que permite utilizar pequenas quantidades de amostras para a detecção da *Clamýdia*, apresentando uma maior especificidade e acurácia no diagnóstico, podendo-se estabelecer uma estimativa mais fidedigna dos níveis desta infecção na cidade de Manaus.
- IV - **Comentário frente à Resolução 196/96 do CNS/MS/CONEP e complementares:**
- Trata-se de um projeto de Mestrado em Biotecnologia da UFAM, cujo orientador é o Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho e tem como colaboradora a Profª Cristina Maria Borborema dos Santos.
- O cálculo da amostra se baseia em pesquisa anterior por outro método diagnóstico e sobre o número de atendimentos do Hospital Francisca Mendes. Foi apresentada uma minuta do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente elaborada.
- A data prevista para o início da coleta das amostras é outubro/2005. Projeto financiado pelo próprio laboratório de Biotecnologia da UFAM.
- Recomenda-se que o nome "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" seja ressaltado no início do documento apresentado às pacientes, com o devido preenchimento dos espaços destinados ao nome do pesquisador e**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM



telefone de contato. Seja acrescentado à equipe o ginecologista responsável pela triagem das pacientes no Hospital Francisca Mendes, no Serviço de Infertilidade.

V- **Parecer:**

Pelo exposto e dos comentários acima apresentados, o parecer deste Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas que este projeto de pesquisa seja considerado **Aprovado com Recomendação**.

VI - **Data da reunião:** 01/9/05

Anexo B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

AMOSTRA DE CONSENTIMENTO APÓS INFORMAÇÃO

- **PESQUISADOR(A):** Norma Suely de Lima Freitas
- **INSTITUIÇÃO:** Unidade: Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) - Universidade Federal do Amazonas
- **TELEFONE:** 3647-4230
- **TÍTULO:** Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras endocervicais de mulheres inférteis pela técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) na cidade de Manaus / Amazonas.
- **EQUIPE E GINECOLOGISTAS RESPONSÁVEIS NO SERVIÇO DE INFERTILIDADE:** Mestranda: Norma Suely de Lima Freitas, Dra. Daria Neves e Dra. Ione Brum.
- **Nº do protocolo:** 131/2005
- **DESCRIÇÃO E OBJETIVO DO ESTUDO**

Este é um estudo epidemiológico. Seu objetivo é investigar a presença de *Chlamydia trachomatis* em mulheres inférteis da cidade de Manaus-AM, através do método da PCR, visando estimar a prevalência da infecção na população pesquisada.

- **TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu recebi a explicação de que eu serei uma das pacientes participantes do projeto. Minha participação será absolutamente voluntária. Este estudo foi planejado para avaliar quantas mulheres do grupo em estudo são portadoras de *Chlamydia trachomatis* e assim determinar a incidência da infecção. Se eu voluntariamente concordar, eu permitirei a coleta do material endocervical para realização da PCR. Nem diferentes testes laboratoriais serão realizados, nem precisarei de hospitalização. Além das amostras coletadas, serei questionada sobre mim mesmo no que se refere a algumas questões de saúde e condições de vida.

Todos os procedimentos serão realizados em apenas uma ocasião.

- **RISCOS ASSOCIADOS AO ESTUDO**

Retirada da amostra endocervical: o seu maior desconforto é no momento da introdução da escova vaginal (*cytobrush*).

- **BENEFÍCIOS**

Participando neste estudo, estarei me beneficiando do exame, pois, assim, será verificado a presença ou não da *Chlamydia trachomatis*. Além disso, estarei contribuindo para o conhecimento de quantas pessoas são afetadas por este tipo de doença.

- **CONFIDENCIALIDADE E AVALIAÇÃO DOS REGISTROS**

Minha participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados ao estudo serão divulgados ao nível científico e autoridades de saúde pública a fim de que sejam tomadas atitudes que garantam a saúde da população.

Minha identidade permanecerá sempre em confidencialidade.

- **DIREITO A RETIRADA DO ESTUDO**

Eu tenho direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais para mim durante minha participação neste estudo.

Eu serei notificada com referência a qualquer nova informação relacionada com o estudo, eu serei capaz de contatar a Dra _____, cujo nome de telefone é _____.

- **PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA**

A minha participação neste estudo é voluntária. Se eu recusar a participação neste estudo, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que tenha direito.

Eu tenho o direito de manter uma cópia assinada deste documento

- **CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO**

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo.

----- Assinatura do Paciente do Estudo	----- Data
----- Assinatura da 1ª Testemunha	----- Data
----- Assinatura do Pesquisador	----- Data

Anexo C

Questionário

1.0 Consentimento da paciente em participar do estudo.

1.1 () Sim

1.2 () Não

Informações Pessoais

2.0 Nome: -----

3.0 Idade: ----- Anos

4.0 Endereço: -----

4.1 () Zona Norte

4.2 () Zona Leste

4.3 () Zona Centro-Oeste

4.4 () Zona Oeste

4.5 () Zona Centro-Sul

4.6 () Zona Sul

5.0 Telefone para contato: -----

6.0 Qual seu estado marital?

6.1 () Solteira

6.2 () União Estável

6.3 () Divorciada/separada

7.0 Qual o nível mais elevado de escolaridade que você completou?

- 7.1 () Ensino Fundamental incompleto
- 7.2 () Ensino Fundamental completo
- 7.3 () Ensino Médio incompleto
- 7.4 () Ensino Médio completo
- 7.5 () Curso profissionalizante
- 7.6 () Ensino Superior incompleto
- 7.7 () Ensino Superior completo

8.0 Qual a sua renda familiar?

- 8.1 () 1 salário mínimo
- 8.2 () 2-4 salários mínimos
- 8.3 () 5-6 salários mínimos
- 8.4 () Acima de 6 salários mínimos
- 8.5 () Sem Renda

9.0 Quantas de suas tentativas de gestações terminaram em nascimento de criança viva?

- 9.1 () Nunca engravidei
- 9.2 () Não tive crianças que nasceram vivas
- 9.3 () Uma
- 9.4 () Duas

10.0 Teve Gravidez Ectópica ? () Sim () Não

11.0 Quantos abortos já teve?

- 11.1 () Nenhum
- 11.2 () Um
- 11.3 () Dois
- 11.4 () Três
- 11.5 () Acima de três

12.0 Tipo de Infertilidade:

12.1 () Infertilidade Primária

12.2 () Infertilidade Secundária

13.0 Qual o número de parceiros sexuais que você já teve na vida? -----

Um () Dois () Três ou Mais () Não relatou ()

14.0 Uso de antibióticos no último ano () Sim () Não

Anexo D

Extração de DNA pelo método Fenol: Clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Adicionou-se 400 μ L de Fenol Hidratado a 400 μ L da amostra, que foi previamente digerida com proteinase K (BAUER & MANOS, 1998) e homogenizou-se suavemente por 10 minutos seguido de 10 minutos de centrifugação a 12.000 rpm. Logo em seguida coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 μ L de Fenol:Clorofórmio: Álcool Isoamílico (25:24:1). Homogenizou-se essa mistura por 10 minutos e a seguir centrifugou-se a 12.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e adicionou-se 400 μ L de Clorofórmio Hidratado 1:1 e agitou-se por 10 minutos seguidos de centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. Coletou-se novamente o sobrenadante e adicionou-se 1/10 (10%) do volume do sobrenadante NaCl 5M e 1000 μ L de Etanol Absoluto gelado, deixando-se precipitando à 0°C por 12 horas.

No dia seguinte, dando continuidade ao procedimento de extração de DNA, pegou-se o material precipitado, centrifugou-se a 10.000 rpm por 30 minutos e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. Logo após, lavou-se o sedimento de DNA (*Pellet*) com 500 μ L de Etanol a 70% gelado, centrifugou-se à 8.000 rpm por 10 minutos e descartou-se o sobrenadante cuidadosamente para não perder o sedimento. Em seguida, deixamos secar o sedimento por aproximadamente 40 minutos no fluxo laminar e fez-se a ressuspensão do sedimento de DNA com 50 μ L de água Milli-Q.

Anexo E

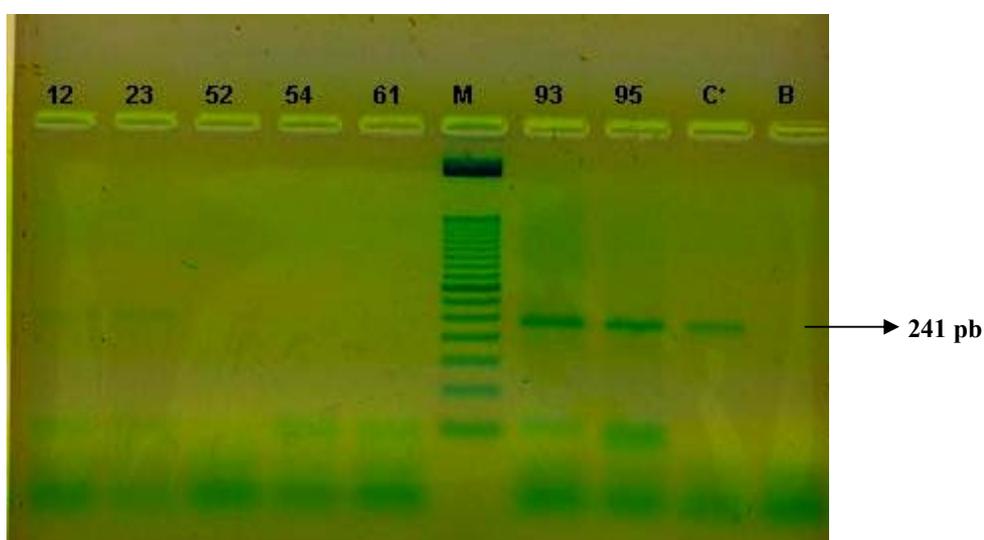


Figura 16 Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity* Ltda; M: Marcador de peso molecular 50 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras: 12, 23, 52, 54, 61, 93, 95; C⁺: Controle Positivo; B: Branco.

Anexo E

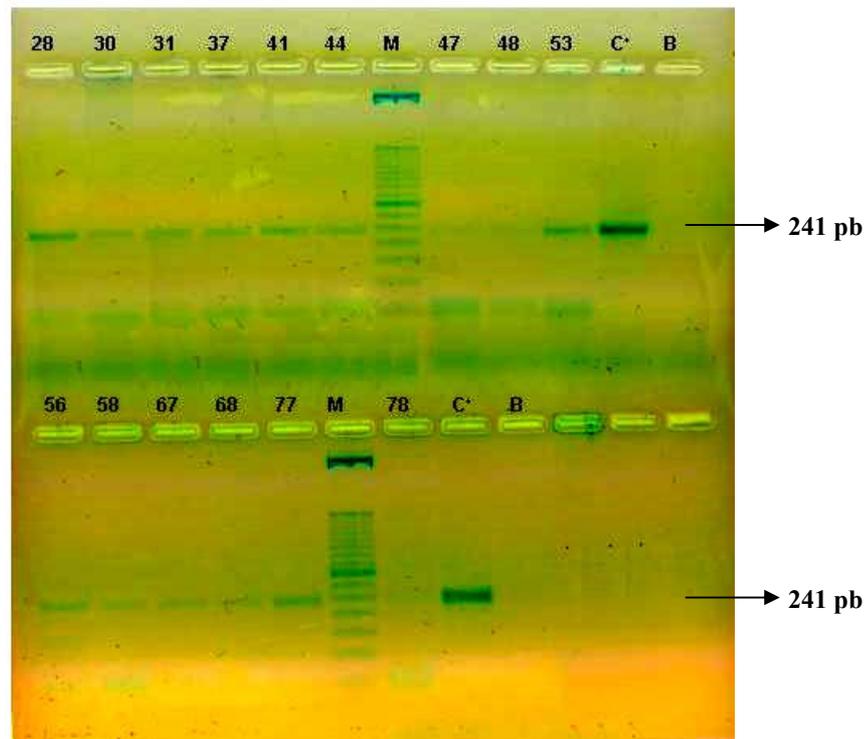


Figura 17 Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo (1µg/µL) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Platinum[®] Taq* DNA Polimerase *High Fidelity* Ltda; M: Marcador de peso molecular 50 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras: 28, 30, 31, 37, 41, 44, 47, 48, 53, 56, 58, 67, 68, 77, 78; C⁺: Controle Positivo; B: Branco.

Anexo E

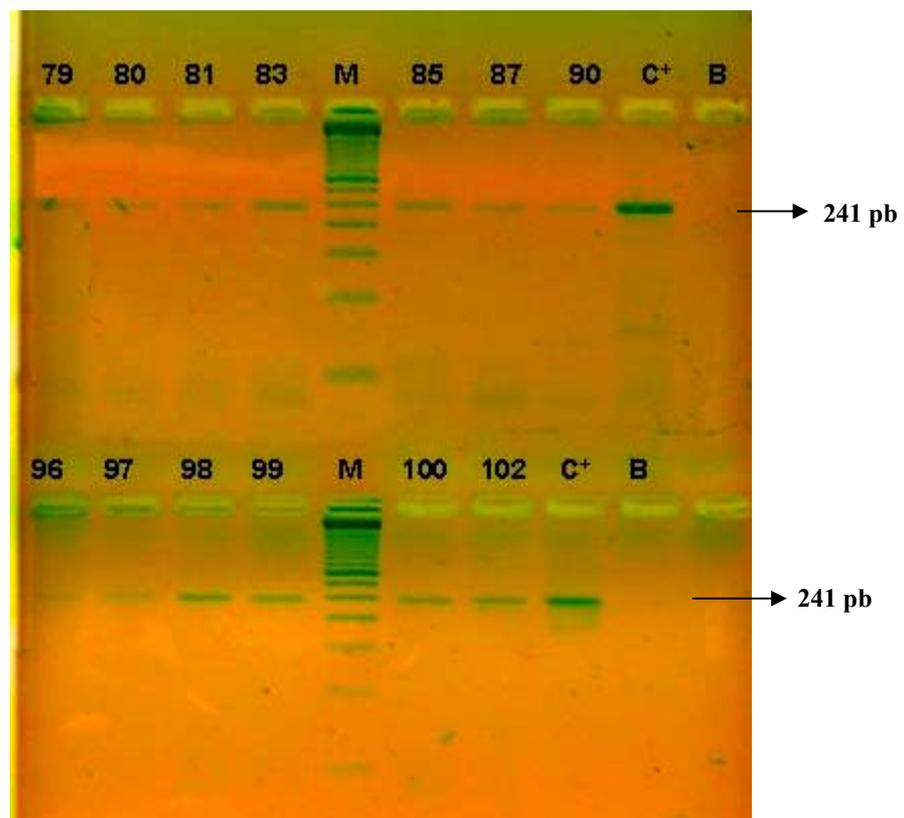


Figura 18 Perfil eletroforético em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) dos produtos amplificados por PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis* utilizando-se os iniciadores KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241pb correspondente ao DNA plasmidial da bactéria e a enzima *Platinum[®] Taq DNA Polimerase High Fidelity* Ltda; M: Marcador de peso molecular 50 pb da INVITROGEN *Life Technologies*; Amostras: 79, 80, 81, 83, 85, 87, 90, 96, 97, 98, 99, 100, 102; C⁺: Controle Positivo; B: Branco.