

DANIELLE ALBUQUERQUE PIRES ROCHA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE PATÓGENOS SEXUALMENTE
TRANSMISSÍVEIS EM MULHERES NO MUNICÍPIO DE COARI, AMAZONAS**

MANAUS/AM

2012

DANIELLE ALBUQUERQUE PIRES ROCHA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE PATÓGENOS SEXUALMENTE
TRANSMISSÍVEIS EM MULHERES NO MUNICÍPIO DE COARI, AMAZONAS**

**Tese apresentada ao colegiado do
Programa Multi-institucional de Pós-
graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas como
requisito para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia, área de
concentração em Saúde**

Doutoranda: Danielle Albuquerque Pires Rocha

Orientadora: Cristina Maria Borborema dos Santos

MANAUS/AM

2012

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

À

Ana Débora Albuquerque de Oliveira

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, porque me abençoou nessa jornada. Especialmente porque me surpreendeu algumas vezes durante esse caminho, sempre moldando o meu caráter.

Ao meu esposo **Márcio Gomes de Oliveira**, com quem eu sou uma só carne, pelo apoio. Mas especialmente por adiar alguns dos seus sonhos para que eu pudesse realizar logo os meus. Como ele fala: PROJETO FAMÍLIA...

Aos meus familiares, especialmente meus pais **Débora Albuquerque Pires Rocha** e **Sebastião Tenório Rocha**, por sempre incentivarem seus filhos nos caminhos da intelectualidade.

À Universidade Federal do Amazonas, pelo investimento na minha qualificação docente.

Aos colegas de curso, funcionários e professores do Programa de Pós-graduação Multi-Institucional em Biotecnologia da UFAM, em especial à profa. **Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos** pela orientação recebida. Agradeço em especial também aos professores **Dr. Edmar Vaz de Andrade**, **Dr. Spartaco Astolfi Filho** e **Dr. José Odair Pereira** pela oportunidade de cursar este Programa, e ao prof. **Dr. José Ferreira da Silva** pela amizade durante estes anos. Agradeço em especial aos colegas **Francisca Andrade de Queiroz** e **Roberto Alexandre Alves Barbosa Filho**, pela ajuda e companhia na execução das atividades laboratoriais.

A todos os colegas professores e alunos do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas em Coari, em especial à Profs. **MsC. Jocilene Guimarães Silva**, pela amizade no trabalho, no curso de doutorado e na vida.

Aos pesquisadores e consultores em algumas etapas deste trabalho, em especial à **Dra. Cíntia Mara Costa de Oliveira**, pela contribuição na realização da PCR em tempo real, ao **MsC. Felicien Gonçalves Vasquez** pela consultoria estatística e **Betânia Albuquerque Pires Rocha Neuman** pela revisão do inglês dos artigos submetidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, pelo apoio financeiro
que tornou este trabalho possível.

À Secretaria Municipal de Saúde de Coari, pela permissão e apoio logístico para
coleta da amostra deste trabalho.

Às minhas amigas da cidade de Coari e do Condomínio Plaza Del Rey, por me
apoiarem e entenderem minha ausência nos últimos meses.

Aos meus amigos e irmãos da Igreja Presbiteriana de Manaus, por serem bênção na
minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

LISTA DE ILUSTRAções

RESUMO

ABSTRACT

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 25 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 28 |
| 2.1. Doenças sexualmente transmissíveis..... | 28 |
| 2.2. Patógenos sexualmente transmissíveis..... | 32 |
| 2.3. Métodos moleculares de diagnóstico..... | 53 |
| 2.4. Epidemiologia das doenças sexualmente transmissíveis no Brasil e no Amazonas..... | 56 |
| 3. OBJETIVOS | 69 |
| 3.1. Geral..... | 69 |
| 3.2. Específicos..... | 69 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 4.1. População e amostra..... | 71 |
| 4.2. Entrevista e coleta da amostra..... | 72 |
| 4.3. Processamento laboratorial..... | 73 |
| 4.4. Análise estatística..... | 87 |
| 5. RESULTADOS | 89 |
| 5.1. Caracterização da amostra..... | 89 |

| | |
|--|------------|
| 5.2. Resultados citológicos..... | 95 |
| 5.3. Resultados moleculares..... | 95 |
| 5.4. Associação entre variáveis..... | 103 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 112 |
| 6.1. Caracterização da amostra..... | 114 |
| 6.2. Prevalência geral das infecções sexualmente transmissíveis..... | 118 |
| 6.3. Infecção pelo HPV..... | 119 |
| 6.4. Infecção pelo HSV-2..... | 129 |
| 6.5. Infecção pelo HCMV..... | 132 |
| 6.6. Infecção pela <i>C. trachomatis</i> | 135 |
| 6.7. Infecção pela <i>N. gonorrhoeae</i> | 141 |
| 6.8. Infecção pelo <i>T. vaginalis</i> | 145 |
| 6.9. Considerações finais..... | 149 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 154 |

REFERÊNCIAS

ANEXOS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês “*Acquired Immune Deficiency Syndrome*”

AM – Amazonas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCUS – Células escamosas atípicas de significado indeterminado, do inglês “*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*”

CD – Clonagem de diferenciação, do inglês “*cluster of differentiation*”, referindo aos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CT – *Chlamydia trachomatis*

DIP – Doença Inflamatória Pélvica

DNA – Ácido Desoxirribonucléico, do inglês “*Desoxiribonucleic Acid*”

dNTP- Desoxirribonucleotídeos

DST – Doenças sexualmente transmissíveis

E – Precoce, do inglês “*Early*”

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ELISA – *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*

ESF – Estratégia Saúde da Família

FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

GSK – *Glaxo, Smith & Kline*, empresa fabricante da vacina bivalente contra o HPV

HCl – Ácido clorídrico

HCMV – Citomegalovírus Humano, do inglês “*Human Cytomegalovirus*”

HIV – Vírus da Imundeficiência Humana, do inglês “Human Immunodeficiency Virus”

HPV – Papilomavírus Humano, do inglês “*Human Papillomavirus*”

HSIL – Lesão Intraepitelial de alto grau, do inglês “*High Squamous Intraepithelial Lesion*”

HSP60 – Proteína do choque térmico 60, do inglês “*heat shock protein*”

HSV – Herpes vírus simples, do inglês “*Herpes Simplex Virus*”

INCA – Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IBOPE – Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística

ISB – Instituto de Saúde e Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, localizado em Coari/AM

L – Tardio, do inglês “*Late*”

LSIL – Lesão intraepitelial de baixo grau, do inglês “*Low Squamous Intraepithelial Lesion*”

LCR – Região longa de controle, do inglês “*Long Control Region*”

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MHC – Molécula principal de histocompatibilidade, do inglês “*Major Histocompatibility Complex*”

Min. – Abreviação de “minuto”

mL – Mililitro

mM - Milimolar

mRNA – RNA mensageiro

µg – Micrograma

µl - Microlitro

MSD – *Merck, Sharp & Dohme*, empresa fabricante da vacina tetravalente contra o HPV

NIC – Neoplasia Intracervical

NG – *Neisseria gonorrhoeae*

nm – nanômetro (unidade de medida)

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Quadro de Leitura Aberto, do inglês “*Open Reading Frames*”

pb – Pares de base (nitrogenadas)

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”

PPSUS – Programa Pesquisa para o SUS (Sistema Único de Saúde)

pRb – Proteína do Retinoblastoma

p53 – Proteínas p53

RNA – Ácido ribonucléico, do inglês “*Ribonucleic Acid*”

rpm – Rotações por minuto

SISCOLO – Sistema de Informação do Câncer de Colo de Útero

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE- Solução de TRIS + EDTA

TPK – Solução de TRIS-HCL, EDTA e proteinase K

TV – *Trichomonas vaginalis*

UBS – Unidade Básica de Saúde

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----|
| Figura 1 – Desenho esquemático da estrutura genômica do HPV | 33 |
| Figura 2 – Representação da estrutura genômica dos Herpesvírus 1 e 2..... | 37 |
| Figura 3 – Representação da estrutura genômica do Citomegalovírus Humano..... | 41 |
| Figura 4 – Localização da cidade de Coari, Amazonas..... | 65 |
| Figura 5 - Distribuição segundo a frequência dos tipos de HPV diagnosticados nas mulheres amostradas na cidade de Coari/AM | 96 |
| Figura 6 – Perfil eletroforético da detecção de DNA genômico..... | 97 |
| Figura 7 – Perfil eletroforético da detecção do HPV através dos iniciadores MY..... | 97 |
| Figura 8 - Perfil eletroforético da detecção da CT através dos iniciadores KL | 97 |
| Figura 9 - Perfil eletroforético da detecção da NG através dos iniciadores Pap | 98 |
| Figura 10- Perfil eletroforético da detecção do TV através dos iniciadores BTUB ... | 98 |
| Figura 11 - Gráficos de amplificação do DNA do Citomegalovírus Humano | 99 |
| Figura 12 - Gráficos de amplificação do DNA do Herpes Vírus Simples 2 | 100 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1 – Herpes vírus patogênicos em humanos | 36 |
| Quadro 2 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à prevalência de infecção pelo HPV em mulheres, usando técnicas moleculares de diagnóstico | 57 |
| Quadro 3 – Estudos epidemiológicos realizados no estado do Amazonas relativos à prevalência de infecção pelo HPV em mulheres, usando técnicas moleculares de diagnóstico | 58 |

| | |
|---|----|
| Quadro 4 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à prevalência de infecção pelo HSV-2 em mulheres | 59 |
| Quadro 5 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à prevalência de infecção pelo HCMV em mulheres | 60 |
| Quadro 6 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à infecção pela <i>C. trachomatis</i> em mulheres | 61 |
| Quadro 7 – Estudos epidemiológicos realizados em mulheres na cidade de Manaus/AM, relativos à infecção pela <i>C. trachomatis</i> | 62 |
| Quadro 8 – Estudos epidemiológicos brasileiros realizados em mulheres relativos à infecção pela <i>N. gonorrhoeae</i> | 63 |
| Quadro 9 – Estudos epidemiológicos realizados em mulheres na cidade de Manaus relativos à infecção pela <i>N. gonorrhoeae</i> | 63 |
| Quadro 10 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à infecção pelo <i>T. vaginalis</i> | 64 |
| Quadro 11- Condições da PCR do DNA genômico humano, para o par de iniciadores ISO2G | 74 |
| Quadro 12 – Iniciadores utilizados para detecção do HPV | 75 |
| Quadro 13- Condições da PCR para detecção do HPV através dos iniciadores MY e GP | 76 |
| Quadro 14 – Condições para reação de purificação dos produtos de PCR através do sistema <i>EXO-SAP</i> | 77 |
| Quadro 15- Condições para reação de sequenciamento | 78 |
| Quadro 16 – Iniciadores e sondas utilizados para detecção do HSV-2 | 79 |
| Quadro 17 – Condições da PCR em tempo real para detecção do HSV-2 | 80 |
| Quadro 18- Condições da PCR em tempo real para detecção do HCMV | 81 |
| Quadro 19- Iniciadores utilizados para detecção da CT | 82 |

| | |
|--|----|
| Quadro 20- Condições da PCR para detecção da CT através dos iniciadores KL1/KL2 | 82 |
| Quadro 21 – Iniciadores utilizados para detecção da NG | 83 |
| Quadro 22 – Condições da PCR para detecção da NG através dos iniciadores PapF/PapR | 84 |
| Quadro 23 – Iniciadores utilizados para detecção do TV | 85 |
| Quadro 24 – Condições da PCR para detecção do TV pelos iniciadores BTUB2/BTUB9 | 85 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 – Distribuição segundo a frequência das variáveis sócio-demográficas das mulheres amostradas no município de Coari/AM | 90 |
| Tabela 2 – Distribuição segundo a frequência do estado conjugal e dados gestacionais das mulheres amostradas no município de Coari/AM | 91 |
| Tabela 3 – Distribuição segundo a frequência e comportamento sexual das mulheres amostradas no município de Coari/AM | 92 |
| Tabela 4 – Distribuição segundo a frequência sobre os dados de HIV e DST das mulheres amostradas no município de Coari/AM | 94 |
| Tabela 5 – Distribuição segundo a frequência de dados relativos aos fatores de risco e sintomatologia das mulheres amostradas no município de Coari/AM | 94 |
| Tabela 6 – Distribuição segundo a frequência dos achados citológicos das mulheres amostradas no município de Coari/AM | 95 |
| Tabela 7 – Distribuição segundo a prevalência dos patógenos detectados nas mulheres amostradas no município de Coari/AM | 96 |
| Tabela 8 – Presença ou ausência de HPV nas mulheres com citologia alterada e tipo viral encontrado nas mulheres amostradas no município de Coari/AM | 101 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 9 – Dados relativos às co-infecções encontradas nas mulheres amostradas na cidade de Coari/AM | 102 |
| Tabela 10 – Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação às mulheres amostradas no município de Coari/AM que apresentaram pelo menos uma infecção | 104 |
| Tabela 11 – Distribuição quanto a frequência da história clínica em relação ao resultado do TV nas mulheres amostradas no município de Coari/AM | 105 |
| Tabela 12 – Distribuição quanto a frequência da história clínica em relação ao resultado da CT nas mulheres amostradas no município de Coari/AM | 106 |
| Tabela 13 – Distribuição quanto a frequência da história clínica em relação ao resultado da NG nas mulheres amostradas no município de Coari/AM | 107 |
| Tabela 14 – Distribuição quanto a frequência da história clínica em relação ao resultado do HPV nas mulheres amostradas no município de Coari/AM | 108 |
| Tabela 15 – Distribuição quanto a frequência da história clínica em relação ao resultado do HCMV nas mulheres amostradas no município de Coari/AM | 109 |
| Tabela 16 – Queixas clínicas apresentadas pelas mulheres infectadas dentre as mulheres amostradas no município de Coari/AM | 110 |

RESUMO

A falta de precisão e rapidez no diagnóstico laboratorial de algumas doenças sexualmente transmissíveis (DST) são problemas enfrentados pelos profissionais que atuam nesta área. Além dessas dificuldades inerentes aos testes, a falta de alguns deles na rede pública de saúde dificultam ainda mais a elucidação de diagnósticos. Por causa dessas dificuldades, as DST são subdiagnosticadas, sendo tratadas indiscriminadamente, valendo-se apenas do diagnóstico clínico. Os métodos moleculares de diagnóstico têm surgidos nos últimos anos como uma excelente alternativa para preencher algumas dessas lacunas deixadas pelos métodos tradicionais. Esta pesquisa teve como finalidade estudar a epidemiologia de alguns patógenos sexualmente transmissíveis a nível molecular, valendo-se para isso de técnicas de biologia molecular, em mulheres atendidas na Atenção Primária à Saúde do Município de Coari, Amazonas (AM). Foram colhidas amostras cervicais de 361 mulheres para exame citológico (Papanicolaou) e exame molecular. Foi realizado o diagnóstico molecular através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e PCR em tempo real para alguns patógenos sexualmente transmissíveis, que foram: Papilomavírus Humano, Herpes Vírus Simples 2, Citomegalovírus Humano, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Trichomonas vaginalis*. Os resultados obtidos mostraram que 47,8% dessas mulheres estavam infectadas por algum dos patógenos estudados. Constatou-se alta prevalência de infecção por Papilomavírus Humano (29,1%), seguida pelo *T. vaginalis* (12,7%), Citomegalovírus Humano (8,3%), *C. trachomatis* (6,4%), *N. gonorrhoeae* (1,4%) e Herpes vírus Simples 2 (0,6%). O tipo prevalente de HPV nas mulheres infectadas foi o HPV 16 (58,1%), seguido pelo HPV 58 (20,0%). As lâminas citológicas satisfatórias para diagnóstico (n=321) mostraram que 7 mulheres (2,1%) exibiram alterações citológicas (ASCUS, LSIL e HSIL), estando 5 delas contaminadas pelo HPV. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre as infecções por patógenos sexualmente transmissíveis e variáveis relacionadas à condições sócio-demográficas, história clínica e comportamento sexual.

Palavras-chaves: Doenças sexualmente transmissíveis (DST); Diagnóstico molecular; Coari; Amazonas; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

ABSTRACT

The lack of precision and speed in the laboratory diagnosis of some sexually transmitted infections (STI) are common problems faced by professionals working in this area. Additionally, the lack of some of them in the public health system become more difficult to elucidate the diagnosis. Because of these difficulties, the STI are underdiagnosed, being treated indiscriminately, using only clinical diagnosis. The molecular diagnostic methods have arisen in recent years as an excellent alternative to fill some of the gaps left by traditional methods. The aim of this research was to study the epidemiology of some sexually transmitted pathogens at molecular level, using molecular biology techniques in women attended in public health system in the city of Coari, Amazonas, Brazil. Samples were collected from 361 women for cervical cytology (Pap Smear) and molecular examination. We carried out molecular diagnosis using the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR) and real-time PCR for some sexually transmitted pathogens, which were: Human Papillomavirus, Herpes Simplex Virus 2, Human Cytomegalovirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis*. The results showed that 47.8% of these women were infected by any of the pathogens. There was a high prevalence of infection with Human Papillomavirus (29.1%), followed by *T. vaginalis* (12.7%), Human Cytomegalovirus (8.3%), *C. trachomatis* (6.4%), *N. gonorrhoeae* (1.4%) and Herpes Simplex Virus 2 (0.6%). The prevalence of HPV type in the infected women was HPV 16 (58.1%), followed by HPV 58 (20.0%). The satisfactory slides for cytological diagnosis (n=321) showed that 7 women (2.1%) showed abnormal cytology (ASCUS, LSIL and HSIL), 5 of them being infected by HPV. There were no statistically significant associations between sexually transmitted infections and the variables related to socio-demographics, medical history and sexual behavior.

Key Words: Sexually Transmitted Infections (STI); Molecular Diagnosis; Coari; Amazonas; Polymerase Chain Reaction (PCR)

1. INTRODUÇÃO

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) são afecções que têm como característica a transmissão através de práticas sexuais. Por causa disso, muitas vezes, tabus, desinformação, vergonha e preconceito, dentre outras coisas, dificultam e atrasam seu reconhecimento e a busca precoce por assistência. As DST estão entre os problemas de saúde mais comuns em todo o mundo, estando entre as cinco principais causas de procura dos serviços de saúde nos países em desenvolvimento (BRASIL, 2009).

O local inicial da infecção de um patógeno sexualmente transmissível em mulheres pode ser a uretra, vagina, colo do útero, reto ou mesmo a orofaringe. Com algumas exceções, os organismos que causam essas infecções tendem a ter vida curta fora do hospedeiro, dependendo, geralmente, da disseminação direta pessoa a pessoa. Esses patógenos podem ser infecciosos, porém, sem a presença de sintomas, e assim a transmissão ocorre, com frequência, em pessoas que não percebem que têm uma infecção (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005; CODES et al., 2006).

As implicações das DST em gestantes são bastante graves, pois podem colocar em risco a saúde e a sobrevivência do feto. Quando não diagnosticadas e tratadas adequadamente podem culminar com aborto, gravidez ectópica ou ainda serem transmitidas de mãe para filho intra-útero ou no momento do parto (transmissão vertical), levando sérios transtornos para o neonato, podendo causar conjuntivite, infecções em orofaringe, otite média, infecções do aparelho respiratório (pneumonia), dentre outras afecções (BRASIL, 2009).

A infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é certamente a DST de maior impacto socioeconômico e biológico. Este retrovírus causa a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA, ou AIDS, do inglês) que é caracterizada por profunda imunossupressão que resulta em infecções oportunistas, neoplasmas secundários, dentre outros problemas. As principais vias de transmissão são o contato sexual, a inoculação parenteral e a passagem do vírus de mães infectadas para seus recém-nascidos. A transmissão sexual é claramente o modo predominante em todo o mundo. Por muito tempo, a maior parte da transmissão sexual ocorreu entre homens que fazem sexo com homens, porém atualmente, a

principal transmissão tem sido heterossexual (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005; RÁCZ, 2008).

Com o advento da AIDS, todas as DST assumiram grande importância no contexto da saúde pública, pois todas são consideradas como facilitadoras da infecção pelo HIV, principalmente aquelas que causam formação de úlceras. Além do HIV, os principais patógenos sexualmente transmissíveis são: *Treponema pallidum*, Herpes vírus simples 2, Citomegalovirus Humano, *Chlamydia trachomatis*, Papilomavírus Humano, *Neisseria gonorrhoeae*, vírus da Hepatite B e *Trichomonas vaginalis*. Estima-se que o risco de uma pessoa se infectar com HIV aumenta em até 10 vezes no caso de sífilis, 6 vezes no caso de clamídia, 18 vezes no caso de herpes genital e gonorréia e 2 a 3 vezes no caso de tricomoníase. O inverso também é verdadeiro: pessoas que vivem com HIV apresentam maior risco de adquirir outras DST, em função da baixa imunidade provocada pelo vírus (SORVILLO et al., 2001; BRASIL, 2007; PASSOS et al., 2008; VAN DER POL et al., 2008; SUNTOKE et al., 2009; MELGAÇO et al., 2011).

O conhecimento da epidemiologia das DST é escasso no estado do Amazonas e nos seus municípios do interior. Neste contexto, foi idealizada esta pesquisa sobre a prevalência das DST em mulheres na cidade de Coari/AM, cidade importante na região do médio Solimões. Esta cidade localiza-se às margens lago de Coari, no Rio Solimões, distante 363 km de Manaus, capital do estado do Amazonas. Tem uma população de aproximadamente de 67.000 habitantes, segundos dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2009), o que a coloca na posição de quinto maior município do Amazonas. É uma das cidades mais ricas da região Norte do Brasil, devido principalmente à exploração de petróleo em suas terras.

Estratégias de prevenção primária (uso de preservativo) e secundária (diagnóstico e tratamento precoces) podem permitir o controle das DST e suas consequências. Para isso, é importante o conhecimento detalhado, preciso, e acima de tudo, regionalizado da epidemiologia das DST. Certamente esse conhecimento tem trazido e ainda trará, à medida em que aumenta, grande auxílio na tomada de decisões relativas ao enfretamento da chamada “feminização da epidemia de AIDS e outras DST” no Brasil e em especial, no estado do Amazonas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

O aparelho genital feminino, que consiste em dois ovários, duas tubas uterinas, o útero, a vagina e a genitália externa, pode ser infectado por uma grande variedade de microrganismos. Algumas infecções, como a candidíase, por exemplo, são bastante comuns e geralmente causam bastante desconforto, porém praticamente nenhuma sequela grave. Por outro lado, outras infecções, como a gonorréia e a clamídia, são causas importantes de infertilidade feminina, a sífilis pode causar graves problemas ao feto e o Papilomavírus Humano (HPV) está implicado na etiologia do câncer de colo de útero. Adicionalmente a isso, o aparelho genital feminino é porta de entrada para microrganismos que causam patologias em sítios anatômicos outros, tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que infecta linfócitos e o vírus da hepatite B, que provoca danos hepáticos. Muitos desses microrganismos são transmitidos por contato sexual, caracterizando-se como Patógenos Sexualmente Transmissíveis (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005; RÁCZ, 2008).

A vagina e o colo de útero são regiões estratégicas para a saúde do trato genital feminino. A composição da cérvix vaginal normal é constituída por células esfoliadas, muco e vários microrganismos que compõem a microbiota cérvico-vaginal normal. A bactéria predominante neste meio é o *Lactobacillus* sp, responsável pela produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e pelo pH ácido nesta região (3,8 a 4,5). A presença de H_2O_2 e a manutenção deste pH ácido inibe o crescimento de vários microrganismos. Por outro lado, sua diminuição está implicada na substituição por outros microrganismos, como por exemplo, a *Gardenerella vaginalis*, e a um risco aumentado de infecção por doenças sexualmente transmissíveis, tais como o HIV, o HPV, o Herpesvírus Simples 2 (HSV-2) o Citomegalovírus Humano (HCMV), dentre outros (CONTI, MALACRINO, MASTROMARINO, 2009; DONATI et al., 2010).

Fatores biológicos, sócio-econômicos e principalmente culturais-comportamentais têm sido largamente discutidos na literatura relativa à incidência e prevalência das DST. Estas têm sido associadas à pobreza e ao baixo índice de escolaridade, mas principalmente à “promiscuidade sexual”, provocando estigma

moral e social nas pessoas que as contraem, levando muitas vezes à deterioração de seus relacionamentos e desvalorização social, além de perda da produtividade econômica (JIMÉNEZ et al., 2001).

Para as mulheres, as DST podem causar sofrimento por complicações e sequelas decorrentes da ausência ou retardo no tratamento, uma vez que, apesar de algumas serem curáveis, a maioria dessas doenças apresenta infecções sub-clínicas ou podem ser assintomáticas por muito tempo, de forma que muitas mulheres somente são levadas a procurarem serviços de saúde em fases mais avançadas da doença, quando se tornam sintomáticas. Além disso, muitos sintomas são inespecíficos (JIMÉNEZ et al., 2001; CODES et al., 2006, BERGEN et al., 2006).

As consequências das mais graves DST para as mulheres são extremamente debilitantes. O carcinoma de colo uterino, cujo agente etiológico mais fortemente implicado é o HPV, um patógeno sexualmente transmissível, é uma das principais causas de óbitos entre mulheres. As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2012, válidas também para 2013 são de que ocorrerão cerca de 17.540 novos casos desta patologia no Brasil, ocupando assim a terceira posição entre os tipos de câncer mais comuns entre as mulheres, ficando atrás apenas do câncer de pele (não melanoma) e do câncer de mama. Para o Estado do Amazonas, os números são ainda mais preocupantes, pois estima-se que esta patologia ocupará a primeira posição entre os tipos de câncer mais comuns entre as mulheres deste estado (BRASIL, 2011).

As mulheres são o segmento da população com AIDS que mais cresce no mundo, principalmente entre aquelas que se encontram em relacionamentos estáveis, o que é chamado de “feminização da epidemia de AIDS”. O Brasil segue esta tendência mundial: a razão entre os sexos vem diminuindo sistematicamente, passando de 15,1 homens por mulher infectada em 1986, para 1,5 homem por mulher em 2005 (BRASIL, 2007).

Outras principais complicações das DST estão relacionadas à saúde reprodutiva da mulher. A doença inflamatória pélvica (DIP), causada por microrganismos como a *Chlamydia trachomatis*, pode causar infertilidade, gravidez ectópica, parto prematuro, infecções puerperais e dor pélvica crônica. Outras

complicações atingem também o feto: aborto, baixo peso ao nascer e sífilis congênita, causada pelo *Treponema pallidum* (JIMÉNEZ et al., 2001).

As mulheres são mais susceptíveis à maioria das infecções transmitidas pelo ato sexual do que os homens. Aspectos biológicos, como a anatomia da vagina e a maior superfície de mucosa exposta durante o intercuro sexual facilitam a infecção. (WHO, 2005).

Aspectos culturais também podem ser citados. Embora esta condição esteja mudando em muitas culturas, em algumas sociedades as mulheres têm pouco ou nenhum controle quanto às decisões relativas à quando e sob quais condições ter relação sexual, com relação ao uso de preservativo pelo parceiro e, menos ainda, das condutas sexuais dele. Segundo Jiménez et al., (2001), até em sociedades ditas mais “modernas”, casais heterossexuais com relações consideradas por eles como “fixas” e onde o relacionamento sexual é também “afetivo” e “duradouro”, o que implica “conhecer” e “confiar” no parceiro, é difícil que o uso do preservativo como meio de prevenção à DST seja negociado, no máximo o é como meio à anticoncepção. Para algumas mulheres, a confiança no parceiro tem que constituir o único meio de prevenção. As relações de gênero, isto é, as relações de poder existentes entre os homens e mulheres, são certamente um grande agravante da vulnerabilidade feminina, hoje considerada como um “permanente estado de vulnerabilidade”. Outros fatores que concorrem para uma maior vulnerabilidade feminina são a pobreza e a violência doméstica (JIMÉNEZ et al., 2001; BRASIL, 2007; GUILHEN, AZEVEDO, 2008).

O rastreamento de indivíduos em risco, porém assintomáticos, é parte importante de qualquer estratégia de controle das DST. O conhecimento da situação epidemiológica poderia ser a base para a implementação de tratamento e de estratégias de rastreamento. Teoricamente, existe possibilidade tecnológica para o controle das DST. Porém, na prática, existem muitos entraves, como por exemplo, a dificuldade de se atingir as pessoas que não procuram os serviços de saúde por sua própria iniciativa, funcionando como reservatórios desconhecidos do patógeno. De outro lado, não há ainda o uso disseminado de métodos rápidos de diagnóstico que não necessitem de equipamentos sofisticados ou refrigeração ou ainda de pessoal qualificado, que possa ser aplicável em populações mais pobres e/ou de difícil

acesso por serviços de saúde de menor complexidade. Além disso, ainda não há uma disponibilidade muito abrangente de métodos de detecção modernos e sensíveis, tais como os métodos de amplificação de ácidos nucleicos, para detecção de patógenos (CODES et al., 2006; GREER, WENDEL, 2008; SIEMER et al., 2008).

Segundo Pinto, Baggio, Guedes (2005) e Jalil et al., (2008), a introdução do uso sistemático de técnicas laboratoriais mais sofisticadas e sensíveis, como a Biologia Molecular, para detecção de patógenos sexualmente transmissíveis tem sido motivo de debate, pois certamente apresentam um maior custo imediato ao sistema de saúde. Porém, o investimento em diagnóstico precoce e tratamento adequado poderá resultar em redução dos custos com os agravos à saúde da população, principalmente em mulheres e crianças.

2.2. PATÓGENOS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

2.2.a. Papilomavírus Humano

O Papilomavírus Humano (HPV) é um patógeno sexualmente transmissível comprovadamente relacionado ao desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas no colo de útero e região vulvo-vaginal e anal (DOOBAR, 2005; PINTO, BAGGIO, GUEDES, 2005).

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* e ao gênero papilomavírus. É um vírus epiteliotrópico, de DNA dupla-fita circular, de cerca de 8.000 pares de bases (pb), que infecta a camada basal do epitélio e expressa seus genes de acordo com o processo de diferenciação terminal dos queratinócitos, induzindo proliferação epitelial e provocando lesões de aspecto verrucoso. Sua principal importância certamente relaciona-se a sua capacidade em provocar a transformação maligna do epitélio, principalmente na zona de transformação da cérvix uterina (DOOBAR, 2005; zur HAUSEN, 2009).

Existem mais de 100 tipos genômicos de HPV, identificados por números que indicam a sequência histórica de sua descrição. São divididos em grupos de acordo com o risco oncogênico: baixo risco (onde se encontram os tipos 6 e 11, principais responsáveis pelas lesões benignas) e alto risco (representados principalmente pelos tipos 16 e 18, envolvidos na transformação maligna do epitélio) (de VILLIERS et al., 2004; BERNARD, 2005; CALLEJA-MACIAS et al., 2005; STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007).

O genoma do HPV pode ser dividido em 3 regiões: uma região longa de controle (LCR, do inglês *Long Control Region*) e as regiões precoce (E, do inglês *Early*) e tardia (L, do inglês *Late*) (Fig. 1). As regiões E e L são as sequências de leitura aberta (ORFs, do inglês *Open Reading Frame*) e codificam as proteínas virais. A LCR, por sua vez, representa cerca de 15% do DNA viral e contém importantes sequências regulatórias da transcrição e replicação virais (SOARES, 1999; PASSOS et al., 2008; de VILLIERS et al., 2004).

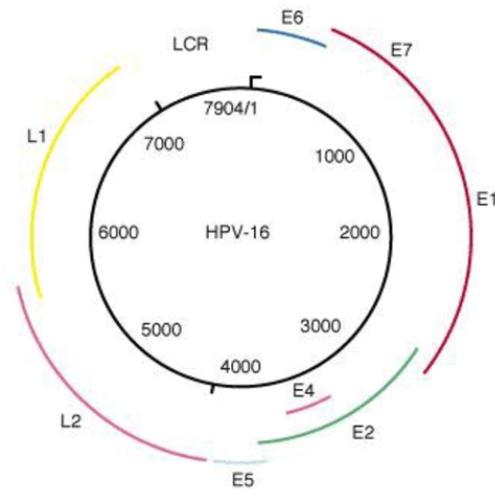


Fig.1 – Desenho esquemático da estrutura genômica do HPV, mostrando as regiões gênicas LCR, E (precoce) e L (tardia). FONTE: www.bolocol.com

As lesões benignas causadas pelo HPV na região vulvo-vaginal são principalmente o condiloma acuminado e as verrugas e papilomas genitais. O condiloma acuminado apresenta-se como lesões solitárias ou múltiplas, que às vezes coalescem; afetam a região perineal, vulvar e perianal, assim como a vagina, e menos frequentemente, o colo. As verrugas e papilomas genitais também podem se apresentar únicas ou múltiplas e têm aspecto clínico característico de lesões em “couve-flor”, brancas ou rosa pálido, dependendo do grau de ceratinização. O diagnóstico é clínico e histopatológico (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005).

O desenvolvimento do câncer de colo de útero está diretamente relacionado à infecção persistente pelo HPV de alto risco oncogênico. Outros fatores também estão relacionados, tais como: *status* imunológico, predisposição genética, nutrição, concomitância com outras infecções sexualmente transmissíveis (*Chlamydia trachomatis*, herpesvírus, por exemplo), dentre outros co-fatores (FINAN, TAMIM, ALMAWI, 2002; STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007; PASSOS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008a).

O câncer cervical é precedido por um longo período de lesões pré-malignas, chamadas de neoplasias intracervicais (NICs) ou lesão escamosa intraepitelial (SIL), que são classificadas em alguns graus (NIC I ou *Low* SIL; NIC II/III ou *High* SIL), dependendo do grau de alteração morfológica das células, vistas através do exame de citologia esfoliativa ou citologia oncológica. As lesões de baixo grau representam

principalmente alterações morfológicas associadas à replicação ativa do HPV (por exemplo, a coilocitose), enquanto as lesões de alto grau indicam a transformação celular, caracterizada principalmente por alterações nucleares (por exemplo: perda de relação núcleo/citoplasma, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear e arquitetura da cromatina) (PINTO, BAGGIO, GUEDES, 2005; STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007; MOYSÉS et al., 2008; TERMINI, VILLA, 2008).

A partir de 1950, e desde então, o rastreamento de lesões cervicais é baseado apenas na citologia, que é um exame simples e de baixo custo. Neste exame, é possível identificar a provável presença do HPV pelo seu efeito citopático conhecido como coilocitose. A citologia apresenta, contudo, limitações, tais como: 5 a 10% do material recebido pelos laboratórios apresenta-se inadequado para diagnóstico - geralmente devido à grande quantidade de sangue - e a subjetividade da interpretação. A literatura acusa certo grau de falsos-positivos e falsos-negativos (MOYSÉS et al., 2008).

Há uma tendência, porém, a considerar-se que a melhor rotina de identificação e acompanhamento das lesões por HPV de forma a prevenir o câncer cervical é a combinação do preventivo de Papanicolaou com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) na qual ocorre a amplificação de regiões conservadas do genoma viral, com uso de iniciadores degenerados e em seguida identificação do tipo viral através do sequenciamento gênico do fragmento amplificado ou através de sondas específicas. A PCR, portanto, teria importante papel complementar ao exame preventivo, principalmente para aumentar a eficiência de programas de rastreamento para a prevenção do câncer cervical. Em estudos epidemiológicos, a PCR é a técnica mais usada (MAGALHÃES et al., 2008, MOYSÉS et al., 2008, PASSOS et al., 2008).

O surgimento da PCR como método na detecção do HPV foi extremamente importante porque a identificação e a implantação de testes eficientes de diagnóstico virológico foram dificultadas pelo fato do HPV não poder ser cultivado em laboratório a partir de amostras clínicas, como é feito com alguns outros vírus, por seu caráter espécie-específico, que limita a propagação em modelos animais, e pelos testes imunológicos não se adequarem à detecção deste vírus (MAGALHÃES et al., 2008; PASSOS et al., 2008).

Em saúde pública, a prevenção à transmissão do HPV é um assunto estratégico. Até recentemente, a interferência nos fatores que propiciam a transmissão do vírus, principalmente aqueles relacionados aos hábitos e comportamentos sexuais, era o foco das campanhas. Assuntos como abstinência sexual, fidelidade mútua e uso de preservativos eram os mais citados, embora apenas as duas primeiras sejam condutas realmente efetivas, uma vez que as lesões por HPV também ocorrem em áreas não protegidas pelo preservativo. Segundo Passos et al., (2008), no entanto, considera-se atualmente que a arma mais eficaz na prevenção primária da infecção pelo HPV pode ser a vacinação.

No Brasil, duas vacinas contra o HPV estão liberadas para uso pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A vacina tetravalente desenvolvida pela *Merck, Sharp & Dohme* (MSD) foi aprovada para uso no Brasil em 2006 em mulheres de 9 a 26 anos e previne contra os tipos 6, 11, 16 e 18, conferindo proteção em relação ao desenvolvimento de lesões benignas e malignas. A vacina bivalente desenvolvida pela *Glaxo, Smith & Kline* (GSK) está aprovada desde 2008 para uso em mulheres de 10 a 25 anos e é voltada contra os HPV 16 e 18. É válido ressaltar que estas vacinas são profiláticas, não terapêuticas, portanto, não tratam de lesões preexistentes HPV-positivas. Vacinas terapêuticas estão também em estudo (PASSOS et al., 2008; TERMINI, VILLA, 2008; GIRALDO et al, 2008).

2.2.b –Herpesvírus Simples 2

Os herpesvírus formam um grupo de vírus de genoma grande, sendo alguns deles patogênicos em seres humanos. Pertencem à família *Herpesviridae*, que compreende três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Os herpesvírus patogênicos em humanos estão descritos no quadro 1, e são classificados em subgrupos definidos pelo tipo de célula mais frequentemente infectada e local de latência (RÁCZ, 2008; PAULUS, NITZSCHE, NEVELS, 2010).

Os Herpesvírus são vírus grandes e envelopados. Os vírions apresentam estrutura complexa que compreende o core, o capsídeo, o tegumento e o envelope. No core, seu genoma consiste de uma única molécula linear de DNA dupla-fita, que

varia dentre 120 a 250 Kb e pode codificar de 70 a 200 proteínas, empacotado em um capsídeo icosaédrico. O nucleocapsídeo é envolto na matriz protéica aparentemente amorfa do tegumento, e externamente o envelope consiste numa bicamada lipídica contendo 10 ou mais glicoproteínas virais (SUBAK-SHARPE, DARGAN, 1998; LEUNG, SAUVE, DAVIES, 2003; RÁCZ, 2008).

Quadro 1 – Herpesvírus patogênicos em humanos

| Subfamília | Gênero | Vírus | Células infectadas |
|---------------------------|--------------------------|---|---|
| <i>Alphaherpesvirinae</i> | <i>Simplexvirus</i> | Herpes Simples tipo 1 e 2 (HHV-1 e HHV-2) | Infectam células epiteliais e produzem infecções latentes nos neurônios |
| | <i>Varicellovirus</i> | Vírus da Varicela-zóster (HHV-3) | |
| <i>Betaherpesvirinae</i> | <i>Cytomegalovirus</i> | Citomegalovírus (HHV-5) | Vírus linfotrópicos, e infectam também outras células |
| | <i>Roseolovirus</i> | Vírus do exatema súbito (HHV-6, HHV-7) | |
| <i>Gama herpesvirinae</i> | <i>Lymphocryptovirus</i> | Vírus Epstein-Barr (HHV-4) | Produzem infecção latente principalmente em célula linfóide |
| | <i>Rhadinovirus</i> | Vírus do Sarcoma de Kaposi (HHV-8) | |

Todos os herpes vírus estudados apresentam uma marcante característica comum: o estabelecimento de um longo ciclo infeccioso latente após uma fase de replicação lítica ativa. Durante o ciclo infeccioso, a maioria dos genes virais são expressos resultando numa grande disseminação viral. Em contraste, a expressão gênica viral é largamente reprimida durante a fase de latência e partículas virais não são formadas (SUBAK-SHARPE, DARGAN, 1998; MAITRA, GUPTA, 2007; PAULUS, NITZSCHE, NEVELS, 2010).

Dentre os herpesvírus patogênicos em humanos, três constituem importantes patógenos transmissíveis por via sexual: o citomegalovírus humano (HCMV) e os herpes simples tipo 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), sendo mais comum o tipo 2.

O herpes genital pode ser causado pelos HSV-1 e HSV-2, porém a infecção pelo HSV-2 é mais comum, mais grave e mais propensa às recorrências. O HSV-1 está mais frequentemente relacionado às lesões orolabiais, com latência no gânglio trigêmeo (90%), porém em cerca de 10% dos casos é causador do herpes genital.

Por sua vez, o HSV-2 é responsável por 90% das lesões genitais, com latência no gânglio sacral e por 10% das lesões orofaciais (PASCHOINI et al., 2001; CONTI, MALACRINO, MASTROMARINO, 2009).

Os genomas dos HSV-1 e -2 são extremamente parecidos e compartilham muitas regiões em comum. O HSV-1 apresenta cerca de 152.261 pb e o HSV-2 é um pouco maior, exibindo cerca de 154.746 pb. O genoma é dividido em duas grandes regiões; a região L (do inglês “*Long*”) e a região S (do inglês “*Short*”), como demonstrado na figura 2 (DOLAN et al., 1998).

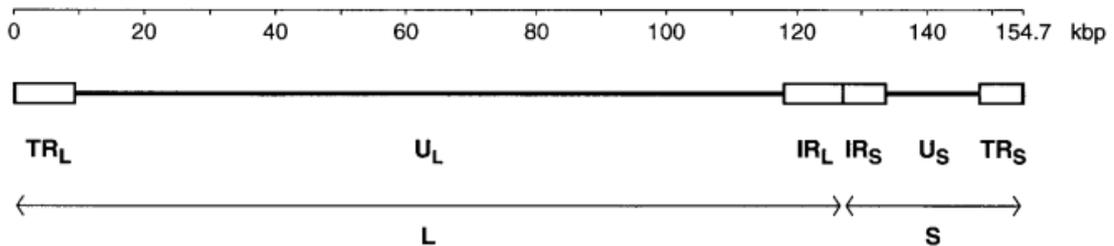


Fig. 2 – Representação da estrutura genômica dos Herpesvírus simples 1 e 2 (linha do meio), com a escala apresentada no topo da imagem. As porções de cópia única do genoma (U_L e U_S) são representadas pelo traço fechado e as regiões repetitivas (TR_L , IR_L , IR_S e TR_S) são representadas pelas caixas claras. FONTE: DOLAN et al. (1998).

A região L compreende a região de cópia única de gene U_L , que apresenta 58 genes numerados de $UL1$ a $UL56$, e as regiões repetitivas TR_L e IR_L , que apresentam 2 cópias dos genes $RL1$ e $RL2$, posicionadas nas extremidades da região de cópia única. De forma semelhante, a região S compreende a região de cópia única U_S , que apresenta 13 genes, numerados de $US1$ a $US12$, posicionada entre as regiões repetitivas IR_S e TR_S , que apresentam, cada uma das regiões, uma cópia do gene $RS1$ (DOLAN et al., 1998).

A transmissão sexual do HSV-2 depende de contato íntimo entre um indivíduo susceptível e um indivíduo excretando vírus ativamente. O vírus deve entrar em contato com as superfícies mucosas para que a infecção seja iniciada. Após a infecção, o vírus replica-se na região genital, perigenital ou anal, colonizando o gânglio sacral. A seguir, os vírus migram pelos axônios até os gânglios sensitivos regionais (neurovirulência), onde permanecem em latência, em uma forma não-infecciosa, em equilíbrio com a célula hospedeira, porém, com reativação periódica e liberação do vírus infeccioso (RÁCZ, 2008).

Nas mulheres, as lesões começam 3 a 7 dias após o contato sexual e causam bastante desconforto. A infecção primária apresenta-se clinicamente pela presença de máculas, pápulas, seguidas por vesículas que estouram, deixando uma área de ulceração bastante dolorosa de forma bilateral na vulva, nádega, períneo, vagina e até na região cervical. O acometimento cervical causa leucorréia, e a infecção traz sintomas sistêmicos, como febre, mal-estar e surgimento de linfonodos inguinais dolorosos. As lesões cicatrizam espontaneamente em 1 a 3 semanas. A gravidade da infecção primária é maior em mulheres do que em homens, geralmente atendo-se a um número limitado de lesões vesiculares na glândula ou no corpo do pênis (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2005).

A infecção primária está associada a um grande índice de replicação viral, que é responsável pela alta taxa de transmissão durante a infecção ativa, e o período de excreção dura cerca de 3 semanas. Quanto mais grave a infecção primária, maior a probabilidade de ocorrência de reativações. O herpes genital recorrente é a forma mais branda da doença, onde um limitado número de lesões aparece no corpo do pênis ou na vulva, durando aproximadamente 7 a 10 dias. Cerca de 90% dos pacientes infectados apresentam recorrências. Nas reativações, os vírus são excretados por cerca de 2 a 5 dias e em concentrações bem mais baixas que na infecção primária. A reativação pode até ser assintomática, facilitando a disseminação (RÁCZ, 2008).

A recomendação para abstinência sexual durante os períodos de infecção ativa é praticamente a única forma de prevenir a transmissão, pois os preservativos não são totalmente eficazes, uma vez que as lesões herpéticas situam-se principalmente na genitália externa (PINTO, BAGGIO, GUEDES, 2005; GOMES et al., 2007).

É importantíssimo levar em consideração que evidências demonstram que as DST podem aumentar o risco de adquirir o HIV em mais de 18 vezes, principalmente se a DST causa úlceras genitais, que é o caso da infecção herpética. Dessa forma, mesmo dado o grande número de diagnósticos possíveis quando do aparecimento de úlceras genitais, é usual considerá-las num primeiro momento como consequência de DST, com o objetivo de tentar reduzir a transmissão de outras

DST, principalmente a AIDS (GOMES et al., 2007; MAITRA, GUPTA, 2007, SUNKOTE et al., 2009).

Outra grave consequência da infecção por HSV é a transmissão para o feto ou recém-nascido. A infecção no útero ocorre como consequência de infecções transplacentárias ou infecção ascendente, e acontece em cerca de 10% dos casos. A forma mais comum de infecção, porém, é o contato do recém-nascido, durante o parto, com secreções maternas infectadas, ocorrendo em 75% a 80% dos casos. Segundo Paschoini et al. (2001), estima-se que a taxa de transmissão da infecção por HSV-2 aos recém-nascidos seja de 40% a 50% nas gestantes com infecção primária e de cerca de 3% a 5% naquelas com reativação. Os casos restantes são atribuídos à infecção pós-natal: parentes ou funcionários de hospital com herpes labial podem atuar como reservatório para a infecção de recém-nascidos (ALANEN et al., 2005; CLEARY et al., 2005).

Considera-se que os casos de herpes neonatal decorrentes de contaminação no canal de parto respondem pelo maior número de complicações no recém-nascido. Sendo a infecção perinatal a principal rota de transmissão para o bebê, o HSV-2 é o principal causador da infecção herpética neste. Podem ocorrer lesões na pele, olhos e boca, encefalite e infecção disseminada. O parto cesariano é o mais recomendado neste caso (WEINBERG et al., 1993; PASCHOINI et al., 2001; CLEARY et al., 2005; RÁCZ, 2008).

Na infecção transplacentária ou ascendente, se esta ocorrer durante a organogênese, frequentemente pode levar ao aborto espontâneo, defeitos congênitos (principalmente microcefalia, calcificações intra-cranianas e microftalmia) e natimortos (PASCHOINI et al., 2001).

Ainda há dificuldades para um exame diagnóstico laboratorial preciso e rápido para detecção do HSV. Várias técnicas têm sido descritas, tais como cultura viral, citologia, microscopia eletrônica, ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), *Western blot*, e PCR. A cultura viral retarda bastante o diagnóstico (cerca de 10 dias) e apresenta elevado custo. A citologia não detecta o vírus, e sim identifica alterações celulares que ele provoca, apresentando baixa sensibilidade. A microscopia eletrônica é usada no diagnóstico de lesões herpéticas ativas, mas apresenta sensibilidade e especificidade baixas, além de alto custo. O ELISA tem sido bastante

usado, pois tem alta sensibilidade, apesar de até pouco tempo atrás os *kits* diagnósticos desenvolvidos não serem capazes de discriminar entre os tipos virais com total certeza. De todas as técnicas, a PCR e a PCR em tempo real (*real time-PCR*) têm sido consideradas altamente específicas para o diagnóstico das infecções herpéticas, apresentando o inconveniente do alto custo para a realidade de muitos serviços diagnósticos, especialmente na rede pública de saúde (PASCHOINI et al., 2001; GREER, WENDEL, 2008; MARAL et al., 2009, SUNKOTE et al., 2009; DINC et al., 2010).

2.2.c – Citomegalovírus Humano

O outro importante herpesvírus que pode ser transmitido por via sexual (embora não exclusivamente) é o citomegalovírus humano (HCMV ou HHV-5), um betaherpesvírus. As células infectadas por este vírus aumentam de tamanho, daí o seu nome *cito* (célula) *megalo* (grande). O citomegalovírus é um clássico agente de infecção oportunista, que pode causar severa doença na ausência de uma efetiva resposta imune, de forma que sua importância tem sido cada vez mais apercebida devido aos recentes tratamentos imunossupressores (por exemplo, na quimioterapia do câncer e no transplante de órgãos) bem como devido ao crescente avanço da epidemia de AIDS no mundo. O HCMV estabelece uma infecção latente com episódios de reativação durante os quais é excretado na saliva, urina, secreção cervical, esperma e leite materno (SPANNO et al., 2007; HO, 2008; BAYRAM, ÖZKUR, ERKILIC, 2009).

Landolfo et al. (2003) trazem uma revisão detalhada sobre o genoma do HCMV. O genoma deste vírus é composto por cerca de 230 kb, com cerca de 225 ORFs de 100 ou mais aminoácidos. Estas ORFs são denominadas sequencialmente de acordo com a sua localização dentro da região única ou repetitiva, pois o genoma do HCMV também apresenta um arranjo de região longa única (UL, do inglês *unique long*), região curta única (US, do inglês *unique short*) e regiões repetitivas. Uma vez que as regiões longa e curta podem ser orientadas em qualquer direção, quatro isômeros genômicos são produzidos na progênie viral, como mostrado na figura 3 (LANDOLFO et al., 2003; BOECK, GEBALLE, 2011).

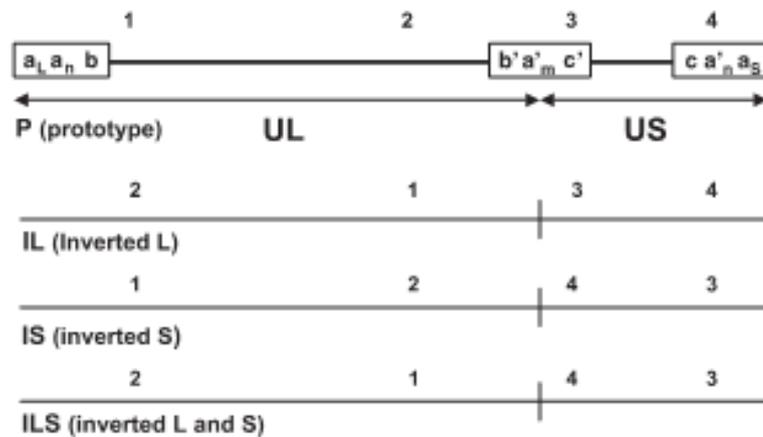


Figura 3 – Estrutura dos quatro isômeros genômicos do HCMV.
Fonte: Landolfo et al., 2003

O HCMV é transmitido pelo contato direto com fluidos corporais de pessoas excretando o vírus e não parece ocorrer por transmissão aérea ou através de aerossóis. Após a aquisição inicial, o vírus é excretado em altos títulos na urina, saliva, lágrima, sêmen e secreções cervicais por meses ou anos. O leite materno também transmite o HCMV, além das transfusões e os transplantes de órgãos de pessoas infectadas (HO, 2008; RÁCZ, 2008; BOECK, GEBALLE, 2011).

A infecção primária inicia-se com a replicação viral no epitélio mucoso no sítio anatômico da porta de entrada. A ligação e a penetração do vírus são eventos rápidos e eficientes. A fusão do vírus e da membrana da célula hospedeira é seguida pela entrada do vírus na célula e sua rápida translocação para o núcleo, onde acontecem os eventos de expressão gênica viral, replicação e montagem do nucleocapsídeo, e a partir daí, formação e liberação das partículas virais. A infecção dissemina-se, de forma que espécimes provenientes de necrópsias mostram que o HCMV infecta uma grande variedade de tecidos: células epiteliais, tais como as das glândulas salivares e túbulos renais, células endoteliais, células progenitoras da linhagem mielócito-monócito, e leucócitos maduros circulantes (LANDOLFO et al., 2003; GERNA, BALDANTI, REVELLO, 2004; SPANO et al., 2007).

Em hospedeiros imunocompetentes, a infecção primária manifesta sinais e sintomas genéricos, tais como dor de cabeça, fadiga e inflamação de garganta. Praticamente nenhum traço específico de infecção é observado, exceto a soroconversão. A latência do HCMV é mantida em todos os indivíduos que sofrem a infecção primária. A infecção latente pode reativar e produzir vírus infecciosos que

novamente estarão presente na saliva, urina e outros fluidos corporais. A reativação é muitas vezes assintomática e favorece a disseminação viral horizontal e vertical (NIGRO et al., 2003; GERNA, BALDANTI, REVELLO, 2004; HO, 2008).

Os quadros de imunodeficiência são um fator importante na propensão do vírus à reativação, com quadro de infecção ativa bem mais severa em relação ao indivíduo imunocompetente. Nestes, a infecção é subclínica em cerca de 90% dos casos. As doenças mais comuns causadas pelo HCMV em pacientes imunossuprimidos são pneumonite, lesões gastrointestinais, hepatite, retinite, pancreatite, miocardite e às vezes encefalite. Adicionalmente, há uma maior propensão às infecções oportunistas bacterianas ou fúngicas (GERNA, BALDANTI, REVELLO, 2004; BAYRAM, ÖZKUR, ERKILIC, 2009; BOECK, GEBALLE, 2011).

A transmissão vertical do HCMV da mãe para o feto ou recém-nascido é comum e desempenha um papel importante na manutenção da infecção na população. Nestes casos, o HCMV pode ser transmitido de 3 formas: transplacentária, intraparto ou através do leite materno (HO, 2008; RÁCZ, 2008).

O HCMV apresenta transmissão intraplacentária natural, que ocorre com maior frequência durante a infecção primária. Durante a reativação da doença também pode ocorrer a transmissão, e o bebê pode sofrer sequelas, porém, é mais difícil, pois os anticorpos maternos contra o HCMV promovem certa proteção ao feto (BIRI et al., 2006; HO, 2008). Neste quesito, porém, Adler (2011) afirma haver certa incerteza em relação a esse papel protetor dos anticorpos maternos, e enfatiza através da citação de alguns estudos, que mulheres infectadas previamente têm transmitido à infecção para o bebê e têm dado à luz tanto a crianças assintomáticas quanto sintomáticas, cujo principal sintoma é perda auditiva.

O tecido uterino materno pode ter sido infectado tanto por via ascendente (infecção proveniente da cérvix) quanto por via hematogênica. Os recém-nascidos assim infectados, quando sintomáticos (cerca de 10%), podem apresentar púrpuras, hepatoesplenomegalia, icterícia, pneumonia e sintomas neurológicos, principalmente calcificação intracranial, microcefalia, deficiência auditiva e convulsões. A maioria dos recém-nascidos (cerca de 90%), porém, apresenta-se assintomática, mas 10 a 15% deles desenvolverão essas sequelas nos primeiros anos de vida. A infecção congênita pelo HCMV ocorre aproximadamente de 0,2 a 2,5% de todos os nascidos

vivos (LEUNG, SAUVE, DAVIES, 2003; BIRI et al., 2006; HO, 2008; ADLER, 2011; BOECK, GEBALLE, 2011).

A transmissão durante o parto é devida à excreção local do vírus na vagina e na cérvix, seguida pela ingestão da secreção pelo feto. O próprio feto começa também a excretar o vírus com cerca de 6 meses de idade. Entretanto, a forma mais comum de transmissão vertical é através do leite materno, devido à presença do vírus neste. A transmissão está relacionada ao tempo de amamentação e à carga viral no leite (HO, 2008; RÁCZ, 2008).

Para o diagnóstico do citomegalovírus, o cultivo viral em fibroblastos humanos é a técnica padrão, mas na prática clínica, a sorologia é o método efetivamente utilizado, inclusive com indicação do exame sorológico em banco de sangue destinado a pacientes transplantados e recém-nascidos abaixo de 1.200 g ao nascer. A detecção do DNA viral pode ser feita através de PCR ou captura híbrida, podendo ser usadas amostras de sangues ou fluidos corporais (RÁCZ, 2008; SOUZA et al., 2010).

2.2.d - *Chlamydia trachomatis*

A *Chlamydia trachomatis* é uma bactéria pertencente à família *Chlamydiaceae* e ao gênero *Chlamydia*, juntamente com a *Chlamydia pecorum*, a *Chlamydia pneumoniae* e a *Chlamydia psittaci*, essas duas últimas também patogênicas em humanos. É uma pequena bactéria que é um parasita obrigatoriamente intracelular, e em função da obrigatoriedade deste parasitismo, por muito tempo as clamídias foram consideradas como vírus. São, porém, bacilos gram-negativos, desprovidos de motilidade, que têm alto tropismo pelos epitélios genital e conjuntival, causando algumas patologias nestes sítios anatômicos (CEVENINI, DONATI, SAMBRI, 2002; MIRANDA, GADELHA, PASSOS, 2003; FREDLUND et al., 2004).

A infecção por clamídia é um exemplo da vitoriosa capacidade de microrganismos patogênicos se adaptarem ao organismo humano de forma silenciosa, pois cerca de 70 a 75% das infecções são assintomáticas. Eis a razão da sua dificuldade em ser diagnosticada e isso garante ao microrganismo a

possibilidade de propagar-se para o trato genital superior, causando danos a longo prazo (OLIVEIRA et al., 2008a).

No aparelho genital, os sintomas aparecem de 1 a 3 semanas após a infecção, mas muitas mulheres e homens não os desenvolvem. Estes sintomas estão relacionados à secreção vaginal, dor e ardor ao urinar, poliúria, cólicas abdominais e sangramento após relação sexual. Se não tratada, a infecção pode avançar para a cavidade e órgãos pélvicos, causando doença inflamatória pélvica (DIP), salpingite, e linfogranuloma venéreo. Esta doença pode causar infertilidade, gravidez ectópica e aderências peritoneais. Na mulher gestante, a infecção pode causar ruptura prematura de membranas, parto prematuro e transmissão neonatal. Nos homens, os efeitos estão mais relacionados à uretrites, cujo principal sintoma é a disúria (CODES et al., 2002; FREDLUND et al., 2004; LOGAN et al., 2005; SIEMER et al., 2008; BÉBÉAR, BARBEYRAC, 2009; SHAW et al., 2011).

A infertilidade é certamente um problema central na infecção por clamídia, com grandes consequências emocionais, sociais e econômicas para o casal infértil. A infertilidade tubária causada pela *C. trachomatis* é comum em mulheres com infertilidade secundária (aquelas que já tiveram gestações, mas não conseguem mais conceber), enquanto que os distúrbios ovulatórios e as patologias endometriais são as principais causas da infertilidade primária (dificuldade de um casal em idade reprodutiva para conceber pela primeira vez depois de, no mínimo, um ano de coito regular sem nenhum tipo de proteção) (PELLATI et al., 2008).

Um outro importante aspecto da infecção por clamídia é sua possível co-participação no desenvolvimento do carcinoma de colo uterino, juntamente com o já referido HPV. Estudos encontram relação positiva entre a presença de clamídia e a presença de alterações citológicas de baixo e alto grau e carcinoma cervical. A infecção clamidial parece ter papel facilitador na carcinogênese cervical por meio da proteína do choque térmico 60 (HSP60, do inglês "*heat shock protein 60*"), pois esta proteína tem ação anti-apoptótica durante a infecção persistente, facilitando a ação das oncoproteínas em células simultaneamente infectadas por HPV de alto risco (FINAN, TAMIM, ALMAWI, 2002; OLIVEIRA et al., 2008a)

Já foram identificados 19 sorotipos de *C. trachomatis*. Os sorotipos A, B, Ba e C infectam principalmente a conjuntiva e estão associados com tracoma; os

sorotipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J e K são predominantemente isolados do trato urogenital e estão associados com uretrite, cervicite, endometrite, salpingite, peri-hepatite, dentre outras patologias; os sorotipos L1, L2, L2a e L3 podem ser encontrados em linfonodos inguinais e estão relacionados com o linfogranuloma venéreo. Os sorotipos do grupo L são mais invasivos que os do grupo D-K, afetando camadas mais profundas de tecido conjuntivo, sendo capazes de disseminar-se para os linfonodos loco-regionais (CEVENINI, DONATI, SAMBRI, 2002; BÉBÉAR, BARBEYRAC, 2009; SHAW et al, 2011).

O genoma da *C. trachomatis* já está completamente disponível. É formado por um cromossomo circular com 1.042.519 pb, além de 7.493 pb contidas no DNA plasmidial. Há cerca de 7 a 10 cópias do plasmídeo por bactéria. O genoma da *C. trachomatis* codifica aproximadamente 875 proteínas (www.chlamydiae.com).

O diagnóstico da *C. trachomatis* pode ser feito através de cultura celular, por imunofluorescência direta, ELISA, captura híbrida ou PCR. Para estes dois últimos, as amostras podem ser coletadas pelos chamados métodos invasivos (*swab* endocervical e uretral e espécimes tomadas do trato genital superior) e não invasivos (primeira urina do dia, e *swab* vulvo-vaginais coletados pela própria paciente). A sorologia pode ser usada, mas apresenta reação cruzada com outras espécies de clamídia e não discrimina entre infecção passada e presente. Na citologia pela coloração de Papanicolau podem ser vistas inclusões citoplasmáticas basofílicas ou eosinofílicas no interior dos vacúolos, causadas pela clamídia, mas não deve ser usada para rastreamento, pois apresenta baixa sensibilidade (LOGAN et al., 2005; CODES et al., 2006; SEADI, 2006; SIEMER et al., 2008; BÉBÉAR, BARBEYRAC, 2009; HADGU, STERNBERG, 2009; LUPPI et al., 2011).

Os estudos relativos aos testes rápidos para diagnóstico de clamídia tem mostrado falta de concordância entre eles e o padrão-ouro (PCR) (CORNETTA, GONÇALVES, BERTINI, 2006). Frequentemente os resultados apontam para uma alta especificidade dos testes rápidos, porém baixa sensibilidade, por isso é citado que não deve ser usado nos programas de rastreamento (GREER, WENDEL, 2008; BÉBÉAR, BARBEYRAC, 2009). São, no entanto, uma opção em contextos em que os pacientes não retornam para acompanhamento clínico (estratégia “testar e tratar”,

para conseqüentemente diminuir o risco de sequelas inflamatórias e disseminação da infecção) (HARKINS, MUNSON, 2011).

Em virtude das infecções por clamídia serem assintomáticas, exames não invasivos (e que utilizam técnicas moleculares), como o de urina, que dispensam um ambiente clínico, podem ser uma importante ferramenta de rastreamento da doença, embora se considere que neste tipo de amostra a sensibilidade é um pouco menor (SIEMER et al., 2008; MASEK et al., 2009; LUPPI et al., 2011; HARKINS, MUNSON, 2011). Segundo Codes et al. (2006) e Marques et al. (2007) a implementação rotineira desse exame por mais de dez anos em algumas regiões dos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos levou a uma declínio significativo da prevalência de clamídia (e também gonorréia), resultando na economia de gastos evitáveis que podem ser aproveitados para outras melhorias na assistência à saúde.

2.2.e - *Neisseria gonorrhoeae*

A doença gonorréia é uma das DST mais antigas conhecidas pelo homem. Há relatos de sua ocorrência nos escritos chineses, nos manuscritos bíblicos do Velho Testamento e em outras literaturas da antiguidade. Seu nome originou-se das palavras gregas GONOS = espermatozóide e RHOIA = corrimento, pela confusão do seu exsudato purulento com o sêmen. É uma doença que muito frequentemente encontra-se em co-infecção com a *C. trachomatis* (PENNA, HAJJAR, BRAZ, 2000; SCHIELKE, FROSCHE, KURZAI, 2010).

A bactéria causadora foi descrita por Albert Neisser, em 1879. A *Neisseria gonorrhoeae* é um conhecido diplococo Gram-negativo, com cerca de 0,6 a 1,0 µm de diâmetro, reniforme com as faces côncavas adjacentes, não-flagelado, não formador de esporos, encapsulado, anaeróbico facultativo. As bactérias encontram-se sempre agrupadas no espaço extracelular ou no citoplasma dos leucócitos polimorfonucleares. O gênero *Neisseria* apresenta cerca de 10 espécies, dentre saprófitas ou patogênicas aos humanos. As patogênicas são a *N. gonorrhoeae*, que infecta o trato urogenital e é um patógeno obrigatório e a *N. meningitidis*, que coloniza a mucosa nasofaríngea e é um patógeno ocasional. Ambas são consideradas colonizadoras de sucesso, pois são capazes de evadir-se do sistema

imune pela constante variação de seus antígenos de superfície (incluindo pili, proteína Opa) ou pela mimetização com moléculas do hospedeiro (PENNA, HAJJAR, BRAZ, 2000; FREDLUND et al., 2004; SCHIELKE, FROSCH, KURZAI, 2010; TOBIASON, SEIFERT, 2010).

O conteúdo genômico da *N. gonorrhoeae* tem como característica especial o fato de cada coco apresentar 3 cópias do genoma completo, sendo portanto, uma espécie poliplóide, conforme indicam estudos usando citometria de fluxo e microscopia de fluorescência (TOBIASON, SEIFERT, 2010). O cromossomo da *N. gonorrhoeae* tem cerca de 2.153.944 pb (número de acesso no GenBank AE004969), e pode apresentar um plasmídeo críptico, vários plasmídeos produtores de beta-lactamase e diferentes plasmídeos conjugativos (FREDLUND et al., 2004).

A gonorréia é uma doença infecciosa do trato urogenital, transmitida quase que exclusivamente por contato sexual ou perinatal. Acomete primariamente as membranas mucosas do trato genital inferior e menos frequentemente a do reto, orofaringe e conjuntiva. A *N. gonorrhoeae* primariamente infecta o epitélio colunar endocervical, com concomitante infecção uretral. A ligação ao tecido mucoso é seguida em 24 a 48 horas pela penetração do organismo entre e através das células epiteliais para chegar ao tecido submucoso. Há uma grande resposta dos leucócitos polimorfonucleares, com descamação do epitélio, desenvolvimento de microabcessos submucosos e formação de exsudato. A seguir, a infecção aguda é substituída gradualmente por macrófagos e linfócitos. A maioria das pacientes infectadas desenvolve sintomas, porém algumas permanecem assintomáticas ou desenvolvem apenas sintomas leves (PENNA, HAJJAR, BRAZ, 2000; WHILEY, TAPSALL, SLOOTS, 2006; PELLATI et al., 2008).

O período de incubação varia entre os casos. Nas mulheres que apresentam sintomas, estes aparecem cerca de 10 dias após o contato sexual com parceiro infectado. Os sintomas predominantes incluem a cervicite, corrimento vaginal e disúria. Se não tratada, a infecção ascendente pode ocorrer entre 10 a 20% dos casos de mulheres infectadas podendo resultar em DIP, que pode manifestar-se como salpingite, endometrite, abscesso tubo-ovariano, que pode levar a gravidez ectópica, esterilidade e dor crônica (NG, MARTIN, 2005; PELLATI et al., 2008; SCHIELKE, FROSCH, KURZAI, 2010).

Outras manifestações que evidenciam a infecção sexual por gonococo são a gonorréia anorectal e a faringite gonocócica, decorrentes das práticas sexuais anal e oral, respectivamente. Uma complicação decorrente da disseminação desta bactéria é a perihepatite aguda, que decorre da extensão direta da *N. gonorrhoeae* (e também da *C. trachomatis*) da tuba uterina à cápsula hepática e ao peritônio adjacente. Esta doença resulta em dor abdominal e sensibilidade na região, dentre outras manifestações. Em casos raros, pode haver uma infecção disseminada, com complicações sistêmicas (PENNA, HAJJAR, BRAZ, 2000; NG, MARTIN, 2005).

A gonorréia nas gestantes associa-se com risco aumentado de aborto espontâneo, parto prematuro, ruptura prematura de membranas e mortalidade fetal perinatal. Mães infectadas podem transmitir a bactéria para o feto intra-útero, durante o parto ou no pós-parto. A conjuntivite gonocócica representa a manifestação mais comum (PENNA, HAJJAR, BRAZ, 2000; NG, MARTIN, 2005).

A *N. gonorrhoeae* vem desenvolvendo resistência a vários agentes antimicrobianos utilizados em regimes de tratamento. A produção de penicilinase pelo gonococo é o tipo mais comum de resistência (resultado da aquisição de plasmídeos que codificam beta-lactamase), seguido pela resistência à tetraciclina e clorafenicol. O tema é tão sério que nas duas últimas décadas, vários países em diferentes regiões do mundo, implementaram programas de vigilância da resistência antimicrobiana para *N. gonorrhoeae*, de maneira que podem monitorar, a nível internacional, a emergência e a prevalência de cepas resistentes e sua circulação. Aqui no Brasil, em 1996, o Programa nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (PNDST/AIDS), do Ministério da Saúde, começou também a implementar a Rede Nacional de Vigilância da Resistência dos gonococos (RENAGOGO), inclusive com a contribuição de laboratórios em Manaus/AM. Aqui nesta cidade, estudos revelam altos índices de resistência a penicilina e a tetraciclina, e índices preocupantes em relação ao ceftriaxone e ciprofloxacino (BARRETO et al., 2004; FERREIRA et al., 2007b).

Para o diagnóstico laboratorial da gonorréia, a cultura bacteriana é geralmente considerada sensível e específica. Embora a *N. gonorrhoeae* seja uma bactéria fastidiosa, a cultura tem sido considerada o padrão-ouro para o diagnóstico definitivo pois além de ser de relativo baixo custo, também provê viabilidade para

testar susceptibilidade aos antibióticos, o que é muito importante no atual contexto das resistências adquiridas. Tanto amostras cervicais quanto uretrais podem ser usadas para detecção do gonococo. Quando a paciente apresentar corrimento uretral, esta sempre deve ser tomada, pois a sensibilidade para detecção do gonococo é maior que na cérvix (NG, MARTIN, 2005; HJELMEVOLL, OLSEN, SOLLID, 2006; WHILEY, TAPSALL, SLOOTS, 2006).

Os testes moleculares de diagnóstico podem ser tanto os de amplificação (PCR, PCR em tempo real), quanto de hibridização através de sondas. Os baseados na amplificação têm alta sensibilidade e apresentam grande vantagem relacionada ao tempo de execução, que é muito menor em relação à cultura. Porém, têm a desvantagem de não discriminarem entre infecção recente ou passada, uma vez que o DNA do gonococo pode permanecer algum tempo depois do tratamento. Como a *N. gonorrhoeae* e a *C. trachomatis* muitas vezes co-infectam as mulheres, alguns kits comerciais estão disponíveis para detecção de ambos, sendo o mais usado aqui no Brasil o *Kit Roche Amplicor PCR*. Estes kits comerciais podem ser inclusive utilizados para detecção na urina e em swabs vaginais coletados pela própria paciente fora do ambiente clínico, o que amplia a detecção em mulheres assintomáticas (NG, MARTIN, 2005; MASEK et al., 2009).

Os testes rápidos para detecção do gonococo ainda não apresentam a sensibilidade ideal. Benzaken et al. (2006) pesquisaram a detecção do gonococo por este método numa clínica de DST na cidade de Manaus/AM e encontraram sensibilidade de 60% em relação à cultura.

2.2.f - *Trichomonas vaginalis*

A tricomoníase vaginal é uma das mais prevalentes infecções sexualmente transmissíveis. É causada pelo *Trichomonas vaginalis*, um protozoário flagelado, descrito por Alfred Donné em 1836. Este microrganismo não apresenta a forma cística, apenas trofozoítica, e apresenta um corpo celular de formato piriforme em lâminas a fresco ou fixadas e coradas. Outros *Trichomonas* colonizadores de humanos são o *Trichomonas tenax*, presente na cavidade oral e o *Pentratrichomonas hominis*, isolado no trato gastrointestinal. Estes não são

patogênicos e exibem tropismo específico para estas localizações anatômicas. O *T. vaginalis* é patogênico e exibe tropismo por células escamosas do trato urogenital, sendo o humano o único hospedeiro natural deste patógeno (SCHWEBKER, BURGESS, 2004).

O *T. vaginalis* possui quatro flagelos anteriores, desiguais em tamanho, um flagelo recorrente e uma membrana ondulante, que se adere ao corpo pela costa e constitui uma extensão da membrana plasmática. O núcleo é elipsóide, localizado próximo à extremidade anterior. Apresenta ainda o axóstilo, uma estrutura rígida e hialina, formada por microtúbulos, que se projeta através do centro do organismo, prolongando-se até a extremidade posterior (SCHWEBKER, BURGESS, 2004; BRAVO et al., 2010).

Este flagelado vive, principalmente, no muco e secreção vaginal das mulheres; em homens, pode colonizar a uretra, próstata e epidídimo, possuindo alto tropismo pelo epitélio escamoso genital. Nestes *habitats*, ele multiplica-se por divisão binária simples e dá origem a uma grande população no lúmen ou nas superfícies mucosas. A sua transmissão acontece sobretudo por via sexual, porém é possível sua transmissão através de fômites, o que justifica sua presença em crianças e pessoas sem atividade sexual. Também é possível a transmissão vertical durante o parto, sendo esta infecção assintomática e auto-limitada (MADICO et al., 1998; SCHWEBKER, BURGESS, 2004).

O período de incubação varia de 4 a 28 dias. Na mulher, as manifestações clínicas variam desde um estado assintomático até um estado de severa inflamação (vaginite). A maioria das mulheres (cerca de 70%) apresenta corrimento vaginal mal cheiroso. Apenas 10 a 20% das mulheres têm sintomas acentuados com corrimento abundante, amarelo, espumoso e mucopurulento. Podem apresentar também odor vaginal anormal e prurido vulvar. A vagina e a cérvix podem estar edemaciadas e eritematosas, com erosão e pontos hemorrágicos, conhecido como aspecto de morango. Dor abdominal também pode ser relatada (MADICO et al., 1998; BRAVO et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2010).

Apesar de sua alta incidência, a infecção por este microrganismo não tem sido alvo de grande atenção por parte dos sistemas de saúde, muito provavelmente devido a sua sintomatologia severa, mas não muito grave. Apenas mais

recentemente, a infecção pelo *T. vaginalis* tem sido associada com uma variedade de efeitos adversos para a saúde da mulher, incluindo nascimento a pré-termo, infecção pós-histerectomia, doença pélvica inflamatória e infertilidade. Uma das mais graves associações tem sido a possibilidade da infecção por *T. vaginalis* facilitar a transmissão do vírus HIV, o que tem sido postulado aumentar em cerca de 2 a 3 vezes o risco de contaminação (MADICO et al., 1998; SORVILLO et al., 2001; MILLER et al., 2008; SUTTON et al., 2007; VAN DER POL et al., 2008).

Biologicamente, algumas razões são sugeridas para esta associação. Primeiramente, a presença do *T. vaginalis* evoca uma resposta inflamatória com grande infiltração de leucócitos, incluindo linfócitos TCD4+ e macrófagos, ambas as células alvos do HIV. Em segundo lugar, o *T. vaginalis* provoca focos hemorrágicos nas mucosas, proporcionando um direto acesso à corrente sanguínea (SORVILLO et al., 2001; McCLELLAND, 2008; SHAFIR, SORVILLO, SMITH, 2009; BRAVO et al., 2010).

Além de aumentar a via de entrada, pelos mesmos princípios, o *T. vaginalis* aumenta a via de saída, isto é, de transmissão do HIV, pois em uma pessoa infectada com HIV, a presença de focos hemorrágicos e processo inflamatório aumenta a quantidade de partículas virais nos fluidos corporais e a presença de células CD4+ e macrófagos infectados. Tem sido observado que a carga viral do HIV diminui após o tratamento para *T. vaginalis* com metronidazol tanto no sêmen quanto no exsudato vaginal. Devido a sua sintomatologia branda em muitos dos casos, as pessoas infectadas continuam suas atividades sexuais normais (ao contrário do que acontece com outras DST, como herpes, por exemplo), facilitando a sua disseminação (SORVILLO et al., 2001; McCLELLAND, 2008; VAN DER POL et al., 2008; SHAFIR, SORVILLO, SMITH, 2009).

O mais comum meio de detecção do *T. vaginalis* é a visualização dos tricomonas móveis em preparações salinas de fluido vaginal, que deve ser realizada dentro de 10 a 20 minutos após a coleta da amostra, ou os organismos perdem a viabilidade. Embora seja barato e rápido, o método depende muito da experiência do citologista e tem baixa sensibilidade (35 a 80%) principalmente em pacientes assintomáticas, devido ao baixo número de organismos na amostra. O teste de Papanicolaou também pode ser utilizado, apresentando também baixa sensibilidade.

Até agora tem sido considerado o padrão ouro para o diagnóstico do *T. vaginalis* a cultura, sendo ideal cultura em meio líquido (MADICO et al., 1998; SCHWEBKER, BURGESS, 2004; BRAVO et al., 2010; HOLLMAN et al., 2010).

A PCR para o diagnóstico do *T. vaginalis* se mostra bastante sensível, variando neste quesito de 81 a 97%, excedendo todos os anteriores, até mesmo a cultura (VAN DER POL, KRAFT, WILLIAMS, 2006; VAN DER POL et al, 2008). O clássico estudo de Madico et al. (1998) comparando estes métodos mostrou que, amostras vaginais de 350 mulheres foram analisadas e a cultura detectou *T. vaginalis* em 6,6% das amostras, enquanto a PCR detectou o parasita em 39,0% das amostras.

2.3 – MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO

Os métodos moleculares de detecção de patógenos exigem técnicas laboratoriais mais sofisticadas e sensíveis. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se destaca nesse contexto, pois marcou uma nova era na Biologia Molecular. Esta técnica permite a obtenção de uma grande quantidade de DNA através da amplificação de uma sequência do DNA de interesse. Esta ferramenta tem revolucionado o Diagnóstico Molecular na área da Saúde, pois permite a detecção de um determinado organismo, mesmo que esteja em quantidades muito pequenas (RODRIGUES, SILVA, SIQUEIRA, 2006; WATSON et al., 2009).

A PCR foi idealizada por Kary Mullis no início dos anos 80, que, por este feito, ganhou o prêmio Nobel de química em 1993. A técnica consiste em uma reação de amplificação de regiões específicas de DNA, através da síntese repetida durante vários ciclos. A cada ciclo, o número de fragmentos amplificados é duplicado. A síntese do DNA é catalisada por um DNA-polimerase termoestável, a partir de um par de oligonucleotídeos sintéticos de fita simples (iniciadores ou *primers*) complementares a sequência de DNA de interesse (SNUSTAD, SIMMONS, 2008; WATSON et al., 2009).

Com o aprimoramento da técnica, algumas⁸ variantes da PCR foram criadas, como a PCR *Hot Start*, a PCR *Touch-Down*, a *Nested PCR* e a PCR em tempo real, que são usadas em algumas situações especiais no diagnóstico molecular.

A PCR *Hot Start* é uma técnica que foi desenvolvida para diminuir a possibilidade da formação de produtos de PCR inespecíficos. A formação de produtos inespecíficos pode acontecer devido ao anelamento inespecífico dos iniciadores a sequências de DNA fita simples presentes na reação, pois esse anelamento pode ser favorecido pelas baixas temperaturas no início da reação. Na PCR *Hot Start*, a enzima DNA-polimerase entra em contato com os outros componentes da reação para começar o seu trabalho de polimerização apenas na primeira etapa de desnaturação, evitando-se a síntese de DNA a partir de anelamentos inespecíficos. O que bloqueia a ação da DNA polimerase a baixas temperaturas é a sua ligação com um anticorpo bloqueador que apenas desliga-se da enzima quando é atingida uma alta temperatura (95°C) (RODRIGUES, SILVA, SIQUEIRA, 2006).

A PCR *Touch-Down* é uma variante da PCR também desenvolvida para tentar diminuir a formação de produtos amplificados inespecíficos, dessa vez através do aumento da temperatura inicial de anelamento (aumento da estringência). Nesta técnica, o termociclador é programado para diminuir de forma sequencial a temperatura de anelamento dos iniciadores nos ciclos iniciais da PCR até determinada temperatura, a qual é supostamente a ideal, sendo mantida nos ciclos restantes (MADICO et al., 1998; RODRIGUES, SILVA, SIQUEIRA, 2006).

A *Nested* PCR é uma técnica que foi desenvolvida para tentar aumentar a sensibilidade da reação de PCR. Nesta técnica, duas reações acontecem, com o uso de dois pares de iniciadores diferentes. A primeira reação acontece de maneira usual, e na segunda reação são usados os produtos da primeira reação como DNA-molde e iniciadores cuja região de anelamento seja interna a estes produtos de amplificação da primeira reação. O tamanho do amplicon da segunda reação será, portanto, menor que o da primeira (RODRIGUES, SILVA, SIQUEIRA, 2006; LIPPMAN et al., 2010; LIMA JUNIOR et al., 2011).

A PCR em tempo real é uma evolução da PCR em que se é capaz de monitorar o progresso da PCR enquanto ela está acontecendo, pois os dados são coletados ao longo de toda a PCR, e não apenas no final da reação. Nesta técnica, utiliza-se o momento (ciclo) da reação no qual a amplificação de um alvo passa a ser detectada pela primeira vez, o *Cycle Threshold* (C_T), ao invés da quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Se mais moléculas-alvo estiverem presentes no início, poucos ciclos serão necessários para alcançar a fase exponencial da reação. É, portanto, um sistema quantitativo, pois quantifica a amplificação da molécula-alvo continuamente durante a PCR (WATSON et al., 2009). Para a PCR em tempo real o aparelho termociclador contém um sistema óptico para excitação da fluorescência, um sistema ótico coletor de fluorescência e um computador com um *software* para aquisição e análise dos dados gerados (NOVAIS, ALVES, 2004).

Para detecção de patógenos (ensaios de presença/ausência), podem ser usados principalmente dois tipos de sistemas: o sistema *SYBR I* e o sistema *Taqman*. O corante *SYBR* se liga entre a fita dupla de DNA, e com a excitação da luz emitida pelo sistema ótico do termociclador, emite uma fluorescência verde. É, no

entanto, uma reação inespecífica, pois o corante se liga a todo DNA fita dupla formado na reação, incluindo os dímeros de iniciadores e produtos inespecíficos. O sistema de reação precisa por isso estar muito bem otimizado em todos os parâmetros (concentração de sais, de dNTPs, de íons, de iniciadores) mas principalmente, na escolha dos iniciadores de melhor performance (NOVAIS, ALVES, 2004).

A PCR em tempo real do tipo *Taqman* é uma variante de PCR em que se utilizam sondas (fragmentos de DNA marcados, usados para hibridizar outra molécula de DNA) utilizadas para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Esta sonda apresenta em uma extremidade um fluoróforo, e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Durante a PCR em tempo real a sonda *TaqMan* hibridiza com a sequência de uma fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação. No processo de amplificação, a sonda *TaqMan* é degradada devido à atividade exonuclease 5' → 3' da *Taq* DNA polimerase, separando o *quencher* da molécula fluorescente durante a extensão. A separação do fluoróforo do *quencher* resulta em um aumento da intensidade da fluorescência. Esse aumento da fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza e quando a amplificação da sequência alvo é estabelecida. O resultado da reação é lido por programa de computador acoplado ao aparelho de PCR em tempo real, não sendo necessário, portanto, processamento pós-reação (corrida em gel de agarose para visualização do fragmento amplificado), facilitando e diminuindo o tempo do processamento (NOVAIS, ALVES, 2004).

2.4 – EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS NO BRASIL E NO AMAZONAS

Existem poucos dados oficiais sobre a epidemiologia das DST que não são de notificação compulsória no Brasil. Aliado a isso, a falta de estudos de base populacional dificulta a visibilidade do problema. A maioria dos dados disponíveis provém, portanto, de investigações regionais.

Um importante estudo no Brasil foi conduzido pelo Ministério da Saúde, idealizado e desenhado pelo Programa Nacional de DST e Aids, publicado no ano de 2008, sobre as “*Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005*” (BRASIL, 2008). Estas capitais foram: Fortaleza, Goiânia, Manaus, Porto Alegre, Rio de Janeiro e São Paulo. Apesar de o Brasil ser um grande país em termos de extensão territorial, e apresentar marcantes diferenças regionais em termos sociais, econômicos e culturais, a ainda apesar do estudo não ser representativo para o País como um todo, ele claramente contribui para se ter uma visão mais ampla não só da epidemiologia das DST no Brasil, mas também para as questões da vulnerabilidade para adquirir DST e os comportamentos de risco nas sub-populações estudadas (homens trabalhadores de indústrias e gestantes, como representantes da população sexualmente ativa, e homens e mulheres que procuraram atendimento em clínica de DST).

Estimativas da prevalência populacional de infecção pelo HPV entre mulheres em todo o mundo variam de 2% a 44% (STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007). A ampla variação nas estimativas é explicada pelas diferenças nas médias de idade das populações estudadas e na sensibilidade do método utilizado para detecção da infecção pelo HPV (FEDRIZZI et al., 2008). Os métodos mais comumente utilizados nas pesquisas são a captura híbrida e a PCR.

Os dados brasileiros seguem a mesma tendência: variam de acordo com características da população estudada e do método utilizado. Dados relativos a estudos brasileiros com mulheres assintomáticas estão sumarizados no quadro 2.

Quadro 2 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à prevalência de infecção pelo HPV em mulheres, usando técnicas moleculares de diagnóstico

| Estudo | Local | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|--------------------------|---|--|--------------------|-------------|
| Igansi (2005) | Porto Alegre/RS | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 28,4% |
| Oliveira et al., (2007) | Pacoti/CE | Estudo de base populacional | PCR | 11,7% |
| Fredizzi et al., (2008) | Florianópolis/SC | Mulheres em exame ginecológico de rotina | Captura Híbrida | 21% |
| Moyses et al., (2008) | Rio de Janeiro/RJ | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 35,3% |
| Magalhães et al., (2008) | Rio de Janeiro/RJ | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 56% |
| BRASIL (2008) | Estudo multicêntrico em: Manaus/AM, Goiânia/GO, Fortaleza/CE, Rio de Janeiro/RJ, São Paulo/SP e Porto Alegre/RS | Gestantes | Captura Híbrida | 40,4% |
| | | Mulheres atendidas em clínica de DST | Captura Híbrida | 44,7% |
| Oliveira et al., (2010) | Niterói/RJ | Mulheres jovens de escolas públicas | PCR | 27,4% |
| Lippman et al., (2010) | São Paulo/SP | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 35,0% |
| Mattos et al., (2011) | Vitória/ES | Mulheres atendidas em clínica de DST | PCR | 27,1% |

No estado do Amazonas, são poucos os dados relativos a infecção pelo HPV em mulheres assintomáticas. O estudo que mais se aproximou desse contexto foi o realizado pelo Ministério da Saúde supracitado (BRASIL, 2008), em seis capitais brasileiras, com mulheres gestantes. Esse e outros estudos em mulheres com lesões cervicais estabelecidas e em mulheres que procuraram atendimento em clínica de DST estão no quadro 3.

Quadro 3 – Estudos epidemiológicos realizados no estado no Amazonas relativos à prevalência de infecção pelo HPV em mulheres, usando técnicas moleculares de diagnóstico

| Estudo | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|-----------------------|---|--------------------|-------------|
| Corrêa (2005) | Mulheres com câncer de colo de útero <i>in situ</i> ou invasivo | | 100,0% |
| Ferreira (2007a) | Mulheres com alterações citológicas (LSIL, HSIL, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas) atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia (FCECON) | PCR | 94,7% |
| BRASIL (2008) | Gestantes | Captura híbrida | 45,3% |
| | Mulheres atendidas em clínica de DST | Captura híbrida | 64,2% |
| Castro et al., (2011) | Mulheres sem alterações citológicas atendidas na Faculdade de Farmácia da UFAM e mulheres com alterações citológicas (LSIL, HSIL, adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas) atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia (FCECON) | PCR | 26,3% |

A infecção pelo HSV-2 é atualmente uma das principais doenças transmitidas sexualmente. Nos ambulatórios de doenças sexualmente transmissíveis, aproximadamente metade das pacientes apresentam evidências prévias ou atuais de infecção quando comparadas a menos de 10% das mulheres examinadas aleatoriamente. A infecção pelo HSV-2 é mais comum em mulheres negras do que em brancas, e entre mulheres de baixo nível socioeconômico (PASCHOINI et al., 2001).

Estudos epidemiológicos relativos à infecção pelo HSV-2 realizados no Brasil não são muitos, e variam em relação ao tipo de amostra feminina estudada e em relação ao método diagnóstico empregado, sendo a maioria estudos de soroprevalência. Dados relativos a estudos brasileiros estão sumarizados no quadro 4.

Quadro 4 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à prevalência de infecção pelo HSV-2 em mulheres

| Estudo | Local | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|--------------------------|---|---|------------------------------|--------------------|
| Weinberg et al., (1993) | São Paulo/SP | Gestantes de baixa renda | ELISA e <i>Western blot</i> | 42,0% |
| | | Gestantes de classe média | ELISA e <i>Western blot</i> | 31,0% |
| Carvalho et al., (1999) | Campinas/SP | Estudantes universitárias | ELISA e <i>Western blot</i> | 7,3% |
| | | Mulheres atendidas em clínica de DST | ELISA e <i>Western blot</i> | 40,9% |
| | | Parturientes | ELISA e <i>Western blot</i> | 22,6% |
| Paschoini et al., (2001) | Ribeirão Preto/SP | Parturientes | ELISA e <i>Western blot</i> | 31,9% |
| Cowan et al., (2003) | (Não informa) | Mulheres recrutadas em clínicas pediátricas, doadores de sangue | ELISA | 42,9% |
| Santos et al., (2006) | Niterói/RJ | Mulheres HIV-positivas | ELISA | 50,7% |
| Gomes et al., (2007) | Campinas/SP | Mulheres atendidas com queixa de úlceras genitais | Biópsia e cultura microbiana | 52,8% |
| Clemens, Farhat (2010) | Estudo multicêntrico em: Fortaleza/CE, Rio de Janeiro/RJ, Porto Alegre/RS e Manaus/AM | Mulheres recrutadas em universidades, escolas e clínicas de adultos e pediátricas em zonas urbana e rural | ELISA | 11,3% |

Nesta revisão bibliográfica, não foram encontrados estudos específicos em mulheres no estado do Amazonas. O estudo multicêntrico de Clemens, Farhat (2010) incluiu mulheres da cidade de Manaus, moradoras tanto da área urbana quanto da rural, porém, não discriminou os números relativos à prevalência na amostra de mulheres de cada cidade.

Embora a doença causada por HCMV seja de baixa frequência, a infecção assintomática por este vírus é largamente encontrada no mundo inteiro. Os dados epidemiológicos mostram que a frequência de soropositividade aumenta com a idade. Há também correlação positiva com baixas condições sócio-econômicas e

com padrões de comportamento sexual (número de parceiros sexuais e idade precoce do primeiro intercuro sexual) (HO, 2008). Estudos brasileiros em relação à soroprevalência em mulheres brasileiras não são muitos, e concentram-se principalmente em gestantes e doadoras de sangue. Não foram encontrados estudos com mulheres no estado do Amazonas. Dados relativos a estudos brasileiros em mulheres estão sumarizados no quadro 5.

Quadro 5 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à prevalência de infecção pelo HCMV em mulheres

| Estudo | Local | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|---------------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------|
| Inagaki et al., (2009) | Aracaju/SE | Gestantes | ELISA | 76,6% |
| Souza et al., (2010) | Cidade de Lages/SC | Mulheres doadoras de sangue | ELISA | 96,4% |
| Matos, Meyer, Lima (2010) | Salvador/BA | Mulheres doadoras de sangue | ELISA | 94,7% |

A *C. trachomatis* é a bactéria sexualmente transmissível mais comum no mundo. As infecções clamidiais são largamente difundidas na população em geral, afetando principalmente população jovem entre 16 e 24 anos de idade. Os fatores de risco incluem uma alta frequência de mudança de parceiro sexual, múltiplos parceiros, início precoce de atividade sexual, passado de DST e sexo desprotegido (TÁBORA et al., 2005; CODES et al., 2006; MARQUES et al., 2007; BÉBÉAR, BARBEYRAC, 2009).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a cada ano ocorram em torno de 92 milhões de novos casos de clamídia, dos quais a maioria ocorre em países em desenvolvimento. No Brasil não se conhece com precisão o padrão de distribuição epidemiológica desta infecção. Os estudos relativos à infecção por *C. trachomatis* no Brasil revelam quase sempre uma alta prevalência, dependendo porém do método de detecção utilizado e das características particulares de cada população estudada. Dados relativos a estudos brasileiros em mulheres estão sumarizados no quadro 6.

Quadro 6 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à infecção pela *C. trachomatis* em mulheres

| Estudo | Local | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|--------------------------|---|--|--------------------|-------------|
| Igansi (2005) | Porto Alegre/RS | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 12,6% |
| Codes et al., (2006) | Salvador/BA | Mulheres atendidas em clínica de planejamento familiar | LCR | 11,4% |
| | | Adolescentes assintomáticas | LCR | 17,1% |
| | | Mulheres moradoras em favelas | LCR | 12,9% |
| Marques et al., (2007) | Recife/PE | Mulheres atendidas em clínica de infertilidade | PCR | 10,0% |
| Oliveira et al., (2007) | Pacoti/CE | Estudo de base populacional | LCR | 4,5% |
| Oliveira et al., (2008a) | Recife/PE | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR em tempo real | 58,6% |
| BRASIL (2008) | Estudo multicêntrico em: Manaus/AM, Goiânia/GO, Fortaleza/CE, Rio de Janeiro/RJ, São Paulo/SP e Porto Alegre/RS | Mulheres gestantes | Captura Híbrida | 9,4% |
| | | Mulheres atendidas em clínica de DST | Captura Híbrida | 7,3% |
| Barcelos et al., (2008) | Vitória/ES | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 7,4% |
| Fernandes et al., (2009) | Campinas/SP | Mulheres atendidas em Clínica de Planejamento Familiar | PCR | 13,5% |
| Guimarães et al., (2009) | Goiânia/GO | Adolescentes assintomáticas | PCR | 14,5% |
| Luppi et al., (2011) | São Paulo/SP | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 8,4% |
| Piazzetta et al., (2011) | Curitiba/PR | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 10,7% |

Os dados sobre a infecção pela *C. trachomatis* no Estado do Amazonas não são muitos, mas já fornecem uma idéia da situação epidemiológica no estado. Cinco estudos estão sumarizados no quadro 7.

Quadro 7 – Estudos epidemiológicos realizados em mulheres na cidade de Manaus/AM relativos à infecção pela *C. trachomatis*

| Estudo | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|-------------------------|---|--------------------|-------------|
| Santos et al., (2003) | Mulheres atendidas em clínica de DST – Fundação Alfredo da Mata e Hospital de Medicina Tropical | PCR | 20,7% |
| BRASIL (2008) | Gestantes | Captura Híbrida | 11,6% |
| | Mulheres atendidas em clínica de DST – Fundação Alfredo da Mata | Captura Híbrida | 10,0% |
| Benzaken et al., (2008) | Gestantes – Trabalhadoras de indústrias | Captura Híbrida | 11,9% |
| | Mulheres atendidas em clínica de DST – Fundação Alfredo da Mata | Captura Híbrida | 10,0% |
| Benzaken et al., (2010) | Mulheres atendidas em clínica de DST – Fundação Alfredo da Mata | Captura Híbrida | 13,0% |
| Freitas (2011) | Mulheres inférteis – Hospital Francisca Mendes | PCR | 52,8% |

A *N. gonorrhoeae* é um patógeno ubíquo, com alta incidência principalmente em países em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde estima que ocorra cerca de 62 milhões de novos casos por ano no mundo (MASEK et al., 2009). No Brasil, o Programa Nacional de DST/AIDS do Ministério da Saúde estima que ocorra mais de um milhão e 500 mil novos casos anualmente, entre homens e mulheres (BARRETO et al., 2004).

Estudos epidemiológicos regionalizados realizados no Brasil apontam dados de prevalência que variam entre 1,2 e 3,3%. Alguns estudos brasileiros estão sumarizados no quadro 8.

Quadro 8 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à infecção pela *N. gonorrhoeae* em mulheres

| Estudo | Local | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|--------------------------|---|--|--------------------|-------------|
| Oliveira et al., (2007) | Pacoti/CE | Estudo de base populacional | LCR | 1,2% |
| Barcelos et al., (2008) | Vitória/ES | Mulheres em exame ginecológico de rotina | Cultura | 2,0% |
| Fernandes et al., (2009) | Campinas/SP | Mulheres atendidas em Clínica de Planejamento Familiar | PCR | 3,0% |
| Guimarães et al., (2009) | Goiânia/GO | Adolescentes assintomáticas | PCR | 2,1% |
| BRASIL (2008) | Estudo multicêntrico em: Manaus/AM, Goiânia/GO, Fortaleza/CE, Rio de Janeiro/RJ, São Paulo/SP e Porto Alegre/RS | Mulheres gestantes | Captura híbrida | 1,5% |
| | | Mulheres atendidas em clínica de DST | Captura híbrida | 3,3% |
| Luppi et al., (2011) | São Paulo/SP | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 1,9% |
| Piazzetta et al., (2011) | Curitiba/PR | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 1,5% |

Estudos realizados no Amazonas também são escassos, destacando-se o estudo realizado pelo Ministério da Saúde e os estudos de Benzaken et al., (2006) e Benzaken et al., (2010), sumarizados no quadro 9.

Quadro 9 – Estudos epidemiológicos realizados em Manaus/AM relativos à infecção pela *N. gonorrhoeae*

| Estudo | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|-------------------------|---|--------------------|-------------|
| Benzaken et al., (2006) | Mulheres atendidas em clínica de DST – Fundação Alfredo da Mata | Cultura | 15,0% |
| BRASIL (2008) | Gestantes | Captura Híbrida | 1,0 % |
| | Mulheres atendidas em clínica de DST – Fundação Alfredo da Mata | Captura Híbrida | 6,1% |
| Benzaken et al., (2010) | Mulheres atendidas em clínica de DST – Fundação Alfredo da Mata | Cultura | 7,1% |

As informações epidemiológicas sobre a prevalência de infecção por *T. vaginalis* não são abundantes. Além de não ser de notificação compulsória, as sequelas pouco graves desta infecção como se acreditava até recentemente, não faziam dela alvo de controle e atenção pelos sistemas de saúde. Estima-se uma incidência de cerca de 170 milhões de casos anualmente no mundo (MILLER et al., 2008; SHAFIR, SOVILLO, SMITH, 2009).

Os principais fatores de risco citados na literatura são: grande número de parceiros sexuais, iniciação sexual precoce, baixo nível educacional, pobreza e uso de ducha vaginal. Na epidemiologia do *T. vaginalis* uma grande disparidade racial existe: há uma prevalência muito maior em mulheres da raça negra. O fator idade também é importante: o *T. vaginalis* é mais prevalente em mulheres mais velhas (acima de 30 anos), diferente da *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, que acometem mais adolescentes e adultas jovens (SUTTON et al., 2007; MILLER et al., 2008; SHAFIR, SOVILLO, SMITH, 2009).

As prevalências encontradas em alguns estudos realizados em mulheres no Brasil estão apresentadas no quadro 10, enfatizando-se, porém, os diferentes métodos de diagnóstico utilizados nestes estudos bem como as diferentes populações representadas. Nesta revisão bibliográfica não foram encontrados estudos realizados em mulheres no Amazonas.

Quadro 10 – Estudos epidemiológicos brasileiros relativos à infecção pelo *T. vaginalis* em mulheres

| Estudo | Local | População | Método diagnóstico | Prevalência |
|--------------------------|--------------|--|-------------------------------------|-------------|
| Oliveira et al., (2007) | Pacoti/CE | Estudo de base populacional | Exame a fresco e citologia | 4,1% |
| Lemos (2008) | Goiânia/GO | Mulheres HIV-positivas | Cultura, citologia e exame a fresco | 18,4% |
| | | Mulheres HIV-negativas | Cultura, citologia e exame a fresco | 8,9% |
| Barcelos et al., (2008) | Vitória/ES | Mulheres em exame ginecológico de rotina | Cultura | 2,0% |
| Oliveira et al., (2008b) | Salvador/BA | Mulheres HIV-positivas | Exame a fresco | 12,5% |
| | | Mulheres HIV-negativas | Exame a fresco | 2,6% |
| Luppi et al., (2011) | São Paulo/SP | Mulheres em exame ginecológico de rotina | PCR | 3,2% |

Se estudos epidemiológicos relativos à prevalência das DST na cidade de Manaus não são muitos, os conhecimentos advindos de estudos a respeito dessas doenças no interior do estado do Amazonas são mais escassos ainda, permanecendo esses dados praticamente desconhecidos. Neste contexto, foi idealizada esta pesquisa sobre a prevalência das DST em mulheres na cidade de Coari/AM, cidade importante na região do médio Solimões.

A cidade de Coari localiza-se às margens lago de Coari (Fig. 4), no Rio Solimões, distante 363 km de Manaus, capital do estado do Amazonas. Tem uma população de aproximadamente de 67.000 habitantes, segundos dados do IBGE (2009), o que a coloca na posição de quinto maior município do Amazonas. É uma das cidades mais ricas da região Norte do Brasil.



Fig. 4 – Localização de Coari, no Amazonas.
Coordenadas: 04°05'06" S 63°08'27" O.
FONTE: www.pt.wikipedia.org/wiki/coari.

Nos últimos 10 anos, devido a plataforma da Petrobras de Urucu, de onde se extrai petróleo e gás natural, intensificou-se a chegada de trabalhadores de todos os lugares do Brasil para o município devido à construção do gasoduto Coari/Manaus, que já iniciou suas atividades de transporte do gás natural para a capital amazonense. A chegada dessas empresas e de seus trabalhadores trouxe certo progresso a esta cidade. Esses trabalhadores, em sua grande maioria, vieram morar na cidade de Coari solteiros ou sem o acompanhamento de suas famílias, o que trouxe consigo a tendência na mudança de comportamentos sexuais principalmente na população feminina local, e com isso, o aumento da disseminação de DST.

Esta situação é preocupante, uma vez que a disseminação de doenças sexualmente transmissíveis acarreta consigo um grande leque de complicações para a vida das pessoas e para o sistema de saúde local, implicando no aumento dos custos em cuidado com a saúde.

O manejo adequado das infecções sexualmente transmissíveis num primeiro contato entre pacientes e profissionais de saúde é uma importante medida de saúde pública. Porém, dados epidemiológicos confiáveis de mulheres brasileiras que norteiem a tomada de decisões são escassos (BARCELOS, 2008).

Diante deste panorama de escassez de dados epidemiológicos sobre algumas das principais doenças sexualmente transmissíveis no Estado do Amazonas, e muito mais especialmente em seus municípios do interior, este estudo propôs-se a investigar a epidemiologia, usando para isso ferramentas da biologia molecular, de alguns patógenos sexualmente transmissíveis em mulheres moradoras na cidade de Coari/AM, de forma a conhecer a realidade local e contribuir para o planejamento de estratégias de intervenção e prevenção para esta população. É válido destacar que as técnicas moleculares de diagnóstico fornecem dados mais precisos a respeito da epidemiologia de algumas doenças, pois são técnicas bem mais sensíveis que as tradicionais. A PCR certamente tem sido a mais usada em pesquisas epidemiológicas por ser a mais apropriada considerando-se a sua alta sensibilidade e especificidade (WENDEL et al., 2002; JOHNSTON, MABEY, 2008).

No ano de 2006, a Universidade Federal do Amazonas inaugurou em Coari o Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB) do Pólo do Médio Solimões, que oferece os cursos de: Enfermagem, Nutrição, Fisioterapia, Biotecnologia, Licenciatura Dupla em Ciências: Física e Matemática e Licenciatura Dupla em Ciências: Biologia e Química. Desde então, projetos de pesquisas começaram a ser realizados sobre estas temáticas expostas, bem como projetos de extensão educativos como retorno da Universidade à sociedade coariense.

Para mudar algumas realidades locais, porém, informação de qualidade, detalhada, precisa e regionalizada é condição essencial. Conhecer melhor a epidemiologia de doenças sexualmente transmissíveis e os fatores de risco a elas associados no interior do estado do Amazonas sem dúvida poderá contribuir para a

tomada de decisões relativas às políticas públicas de saúde voltadas para prevenção e diagnóstico precoce dessas doenças por parte dos gestores locais, e das ações educativas realizadas pelos cursos de Saúde do Instituto de Saúde e Biotecnologia do Médio Solimões da Universidade Federal do Amazonas.

3.1. Objetivo geral:

- Determinar o perfil epidemiológico da infecção por alguns patógenos sexualmente transmissíveis em uma amostra de mulheres moradoras do município de Coari/AM

3.2. Objetivos específicos:

- Detectar através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou PCR em tempo real o DNA dos seguintes patógenos sexualmente transmissíveis: Papilomavírus humano, Herpes vírus simples 2, Citomegalovírus Humano, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*
- Determinar os genótipos dos Papilomavírus Humanos encontrados
- Relacionar os dados provenientes do diagnóstico molecular do HPV com os dados do exame citológico de Papanicolaou
- Relacionar os resultados relativos à detecção dos patógenos sexualmente transmissíveis ao perfil clínico e comportamental das mulheres, determinando possíveis associações
- Colaborar para a construção de dados epidemiológicos que norteiem a implantação de programas de controle e prevenção regionalizados das DST pelos cursos de saúde do Instituto de Saúde e Biotecnologia do Médio Solimões da UFAM e possivelmente, também pela Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura Municipal de Coari

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo de prevalência, desenvolvido no município de Coari, situado na região do Médio Solimões, estado do Amazonas, Brasil, e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) em parceria com o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e com o Ministério da Saúde através do Programa Pesquisa para do SUS (PPSUS), segundo o edital 07/2009.

Foi realizado um estudo transversal com mulheres atendidas nas Unidades Básicas de Saúde (UBS) do referido município, assistidas pela Estratégia de Saúde da Família (ESF). Este projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFAM sob o CAAE n° 0010.0.115.000-10 e aprovado dia 18 de fevereiro de 2010 (Anexo 1).

4.1. População e amostra – A população de referência consistiu de mulheres cadastradas para atendimento nas UBS do Município de Coari, atendidas pelos(as) enfermeiros(as) que se dispuseram a colaborar com este projeto, de acordo com solicitação ao secretário de saúde do município (conforme autorização de declaração de anuência), durante a consulta de rotina dessas mulheres, quer apresentassem queixas clínicas ou não.

O cálculo amostral considerou a prevalência de 42% de DST em geral (BRASIL, 2008), com margem de erro de 5% e confiança de 95%, tendo como resultado uma amostra de 385 mulheres. Porém, devido a dificuldades logísticas durante a coleta, a amostra final desta pesquisa consistiu de 361 mulheres, registradas sequencialmente nesta pesquisa de acordo com demanda espontânea. Das 11 UBS do município, foi realizada coleta em 10, ficando uma de fora da pesquisa, pois era uma UBS apenas para usuários da zona rural. Todas as participantes do estudo foram esclarecidas quanto a importância do mesmo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

Os critérios de inclusão foram: mulheres sexualmente ativas, acima de 18 anos, que aceitaram participar desta pesquisa assinando o TCLE, conforme resolução n° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), quer apresentassem queixas clínicas ou não, quer estivessem grávidas ou não. Foram consideradas

sexualmente ativas todas as mulheres que já fizeram sexo na vida, segundo recomendação de França Jr. et al., (2003) em publicação do Ministério da Saúde/Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (MS/IBOPE). Durante a abordagem às mulheres, ficou claro que se tratava de mulheres sexualmente ativas que mantinham relações sexuais com parceiros do sexo masculino, e não com mulheres ou não apenas com mulheres.

Os critérios de exclusão: mulheres hysterectomizadas e mulheres submetidas a tratamento recente (últimos 3 meses) para infecções genitais, quer por via sistêmica ou tópica.

4.2. Entrevista e coleta das amostras – Inicialmente as mulheres foram convidadas a participar da pesquisa e foram feitas perguntas iniciais para certificar-se que se enquadravam ou não nos critérios de inclusão. As mulheres foram então entrevistadas respondendo um questionário padrão contendo perguntas estruturadas e não-estruturadas sobre as principais informações clínicas, sócio-econômicas e comportamentais (Anexo 3). A confidencialidade das respostas foi garantida. Todas as mulheres foram submetidas a consulta e exame físico, incluindo exame pélvico, pelo(a) enfermeiro(a) responsável por esse procedimento na UBS.

A amostra foi coletada com o auxílio de espéculo vaginal utilizando-se escova endocervical (*citobrush*) e espátula de madeira. As amostras foram obtidas em triplicata para o estudo molecular e em duplicata para confecção da lâmina citológica para a citologia oncótica.

A primeira coleta correspondeu às amostras destinadas ao estudo molecular, que foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL contendo 400 µL de tampão TRIS-EDTA (TRIS-HCl 10 mM e EDTA 1mM ph 8,0) e colocados imediatamente no gelo antes de serem armazenados no *freezer* a -20°C nas dependências do ISB/Coari. Para o estudo citológico foram confeccionadas lâminas citológicas contendo material ecto- e endocervical, e fixado em álcool 96° e assim transportadas ao ISB/Coari e depois para Manaus/AM.

4.3. Processamento laboratorial

4.3.1. Exame citológico - As lâminas foram coradas segundo a técnica de Papanicolaou (Anexo 4) e analisadas por dois citopatologistas experientes. Para cada paciente, foi emitido um laudo pelo citopatoologista seguindo a classificação preconizada pelo Sistema de Informação do Câncer de Colo de Útero (SISCOLO) (Anexo 5).

4.3.2. Extração do DNA e verificação da eficiência da extração - As amostras foram transportadas acondicionadas em gelox para Manaus a fim de serem processadas no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia na UFAM. Depois de descongeladas à temperatura ambiente, as amostras foram submetidas ao processo de extração de DNA. Foi acrescentado 400,0 µL de tampão proteolítico TPK (TE [TRIS HCl 50 mM + EDTA 50mM pH=8,0], Tween 20% e Proteinase K 10mg/ml), e incubados por 60 minutos a 56°C e por 10 minutos a 95°C em banho seco. A seguir, o DNA foi extraído pelo método fenol/clorofórmio, precipitado com etanol absoluto e ressuspendido em 50,0 µL de água ultra-pura (pH 7,6), segundo consta no anexo 6 (SAMBROOK et al., 1989).

Em seguida, foi realizada uma PCR para verificação da eficiência da extração do DNA, utilizando-se um par de iniciadores designado ISO 2G que flanqueia uma sequência de 260 pares de bases de uma região microssatélite (GATA)₁₃ do cromossoma 15 humano (PONTES, 2002). Para todas as reações deste trabalho foram utilizados um controle negativo (água) e um controle conhecidamente positivo. O sistema da reação foi preparado com o volume final de 25,0 µL, conforme mostrado abaixo:

Sistema de reação para os iniciadores ISO2G:

| | |
|-----------------------------|----------------|
| H ₂ O | 10,3 µL |
| Tp 5X | 5,0 µL |
| MgCl ₂ 25mM | 2,0 µL |
| dNTP 10mM | 0,5 µL |
| ISO2G 5pmol | 5,0 µL |
| Taq DNA polimerase (5U/µL)* | 0,2 µL |
| DNA | 2,0 µL |
| Volume final | 25,0 µL |

* Enzima Gold Taq DNA polimerase (PROMEGA)

A reação foi realizada em termociclador Veriti, da *Applied Biosystems*, de acordo com as condições de termociclagem mostradas no quadro 11.

Quadro 11 – Condições da PCR do DNA genômico humano, para o par de iniciadores ISO2G

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo (min.) | Reação |
|------------------|------------------|--------------|----------------------|
| 1 | 95 | 2 | Desnaturação inicial |
| 40 | 95 | 1 | Desnaturação |
| | 50 | 1 | Anelamento |
| | 72 | 1 | Extensão |
| 1 | 72 | 5 | Extensão final |

A seguir, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo (1µg/µL) (*LGC Biotecnologia*) ou corante Gel Red (*Uniscience*). Depois da corrida, as bandas foram visualizadas por luz ultravioleta com o auxílio de um transiluminador e fotografadas em câmera digital *Olympus SP-500uz*.

Todas as amostras foram positivas na reação para verificação de DNA genômico e foram então realizadas as PCR para detecção dos patógenos sexualmente transmissíveis propostos.

4.3.3 - Detecção do HPV e genotipagem - Para a detecção do HPV foi utilizada a técnica da *nested-PCR*, com a finalidade de aumentar a sensibilidade da detecção. Para a primeira PCR foram utilizados os iniciadores degenerados MY09 e MY11 (quadro 12), descritos por (MANOS et al., 1989). Para a segunda reação utilizou-se o par de iniciadores GP5+/GP6+ (de RODE HUSMAN et al., 1995), conforme os sistemas de reação mostrados abaixo:

Quadro 12 – Iniciadores utilizados para detecção do HPV

| Patógeno | Iniciadores | Sequência* | Tamanho do amplicon |
|----------|-------------|---------------------------------|---------------------|
| HPV | MY09 | 5' CgTCCMARRgCAWACTgATC 3' | 450pb |
| | MY11 | 5' gCMCAgggWCATAAYAATGC 3' | |
| | GP5+ | 5' TTTgTACTgTggTAgATACTAC 3' | 150 pb |
| | GP6+ | 5' gAAAAATAAACTgTAAATCATATTC 3' | |

* Iniciadores degenerados são aqueles que apresentam algumas posições nucleotídicas variáveis, neste caso: M=A ou C; R=A ou G; W= A ou T; Y=C ou T

Sistema de reação para PCR com os iniciadores MY09/MY11:

| | |
|-----------------------------|----------------|
| H ₂ O | 13,6 µL |
| Tp 10x | 2,5 µL |
| MgCl ₂ 50mM | 0,8 µL |
| dNTP 10mM | 0,5 µL |
| MY09 5pmol | 2,5 µL |
| MY11 5pmol | 2,5 µL |
| Taq DNA polimerase (5U/µL)* | 0,1 µL |
| DNA | 2,5 µL |
| Volume final | 25,0 µL |

* Enzima Platinum Taq DNA polimerase (INVITROGEN)

Sistema de reação para *nested*-PCR com os iniciadores GP5+/GP6+:

| | |
|-------------------------------|----------------|
| H ₂ O | 15,6 µL |
| Tp 10x | 2,5 µL |
| MgCl ₂ 50mM | 0,8 µL |
| dNTP 10mM | 0,5 µL |
| GP5+ 5pmol | 2,5 µL |
| GP6+ 5pmol | 2,5 µL |
| Taq DNA polimerase (5U/µL)* | 0,1 µL |
| DNA (produto da reação do MY) | 0,5 µL |
| Volume final | 25,0 µL |

* Enzima Platinum Taq DNA polimerase (INVITROGEN)

As duas reações para detecção do HPV seguiram as condições de termociclagem apresentadas no quadro 13. Os produtos da PCR com os iniciadores MY09/MY11 foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% e os produtos da reação de GP5+/GP6+ em gel de agarose a 2,0%, ambos corados com brometo de etídeo (1µg/µL) (LGC Biotecnologia) ou *Gel Red (Uniscience)* para visualização através de transiluminador e fotodocumentação.

Quadro 13– Condições da PCR para detecção do HPV através dos iniciadores MY e GP

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo (min.) | Reação |
|------------------|------------------|--------------|----------------------|
| 1 | 95 | 1 | Desnaturação inicial |
| 40 | 95 | 1 | Desnaturação |
| | 55 | 1 | Anelamento |
| | 72 | 1 | Extensão |
| 1 | 72 | 5 | Extensão final |

Em seguida, foi realizada a genotipagem dos HPV encontrados nas amostras. Para isso, as amostras foram sequenciadas em Sequenciador *ABI Applied Biosystems* diretamente dos produtos da PCR utilizando-se ou o par de iniciadores MY09/MY11 ou o par GP5+/GP6+, que flaqueiam um fragmento da região L1 viral. Após a PCR, todas as amostras amplificadas foram purificadas com o Sistema Exo-

Sap (GE Healthcare), composto pelas enzimas Exonuclease e Fosfatase Alcalina. Esta purificação consiste na remoção de todos os reagentes não incorporados (dNTP, sais, excesso de iniciadores) durante a reação de amplificação.

Sistema para reação de purificação:

| | |
|---------------------|----------------|
| H ₂ O | 2,33 µL |
| Exonuclease | 0,27 µL |
| Fosfatase alcalina | 0,40 µL |
| Produto de PCR | 10,0 µL |
| Volume final | 13,0 µL |

A reação foi submetida as condições de temperatura especificadas no quadro 14 para atividade ótima das enzimas e subsequente inativação das mesmas.

Quadro 14 – Condições para reação de purificação dos produtos de PCR através do sistema *EXO-SAP*

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo (min.) | Reação |
|------------------|------------------|--------------|------------------------|
| 1 | 37 | 30 | Atividade enzimática |
| 1 | 80 | 15 | Inativação das enzimas |
| 1 | 10 | 1 | Estabilização final |

A seguir foi preparada a reação de sequenciamento em placa específica para eletromicroinjeção em sequenciador automático, contendo 96 poços. A reação consistiu nos volumes especificados abaixo, foi realizada em Termociclador Veriti da *Applied Biosystems* e as condições de termociclagem estão descritas no quadro 15.

Sistema da reação de sequenciamento para os iniciadores MY e GP:

| | |
|--------------------------------|----------------|
| H ₂ O | 4,7 µL |
| Tp 5x | 2,0 µL |
| Iniciador 5 pmol | 1,0 µL |
| Big Dye | 0,3 µL |
| DNA (produto da reação de PCR) | 2,0 µL |
| Volume final | 10,0 µL |

Quadro 15 – Condições para reação de sequenciamento

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo (seg.) | Reação |
|------------------|------------------|--------------|----------------------|
| 1 | 96 | 60 | Desnaturação inicial |
| 15 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 50 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 75 | Extensão |
| 5 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 50 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 90 | Extensão |
| 5 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 50 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |

Ao final da reação, a precipitação do DNA foi feita seguindo o protocolo descrito no Anexo 7. Em seguida, as amostras foram sequenciadas em sequenciador automático ABI 3130XL *Applied Biosystems*, segundo instruções do fabricante.

Os arquivos gerados pelo sequenciador automático foram submetidos a processamento de Bioinformática. Os arquivos zipados foram enviados inicialmente para análise do cromatograma no programa PHERD, disponível no site do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília. Todas as sequências foram copiadas para um arquivo de bloco de notas e editadas manualmente. A

seguir, para identificação do tipo viral, as sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados *GenBank*, disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov, através do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

4.3.4 – Detecção do Herpes Vírus Simples 2

A detecção do Herpes Vírus Simples 2 foi realizada através da PCR em tempo real, com um ensaio do tipo *TaqMan*. Foi utilizado o *master mix TaqMan® Environmental Master Mix 2.0* da *Applied Biosystems*. Este *master mix* é adequado para vários tipos de amostra, até amostras com altos níveis de contaminantes. Os iniciadores utilizados foram os HSV-F e HSV-R que amplificam ambos os HSV 1 e 2 com igual eficiência. Para determinação de cada tipo viral, diferentes sondas são utilizadas, podendo inclusive ser realizada uma *PCR multiplex* se forem usados fluoróforos diferentes para cada sonda. Os iniciadores e sondas utilizados foram descritos por Corey et al., (2005) e estão explicitados no quadro 16 e o sistema da reação está descrito abaixo:

Quadro 16 – Iniciadores e sondas utilizados para detecção do HSV-2

| Patógeno | Iniciadores | Sequência | Fluoróforo/quencher |
|----------|-------------|-----------------------|---------------------|
| HSV | HSV-F | CgCATCAAgACCCACCTCCTC | - |
| | HSV-R | gCTCgCACCCACgCgA | |
| HSV-2 | HSV-2 | CggCgATgCgCCCCAg | 6-FAM/BHQ-1 |

Sistema de reação para detecção do HSV-2:

| | |
|---------------------|----------------|
| H ₂ O | 4,5 µL |
| Primer F 10 pmol | 0,5 µL |
| Primer R 10 pmol | 0,5 µL |
| Sonda 10 pmol | 0,5 µL |
| Master Mix (2X) | 10,0 µL |
| DNA | 4,0 µL |
| Volume final | 20,0 µL |

As amostras foram distribuídas em placa apropriada para leitura óptica (*MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate*) da *Applied Biosystems*. A placa foi levada ao aparelho de PCR em tempo real *Step One™ Real Time PCR Systems*, da *Applied Biosystems*. As condições de termociclagem estão descritas no quadro 17.

Quadro 17 – Condições da PCR em tempo real para detecção do HSV-2

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo | Reação |
|------------------|------------------|--------|------------------------|
| 1 | 95 | 5 min | Ativação da Polimerase |
| 40 | 95 | 15 seg | Desnaturação |
| | 60 | 60 seg | Anelamento/Extensão |

Ao final da reação, o resultado foi obtido a partir do programa *Step One™ Software v2.0*, instalado no computador acoplado à máquina de PCR em tempo real. As amostras foram feitas em cópia única, sempre com controles positivos e negativos presentes na placa, e, no caso das amostras positivas, a reação foi repetida em triplicata. As amostras foram consideradas positivas se o *cycle threshold* (CT) foi até 37.

4.3.5 – Detecção do Citomegalovírus Humano (HCMV)

Para detecção do Citomegalovírus Humano foi utilizada novamente a PCR em tempo real. Para isto, foi utilizado um ensaio pronto do tipo presença/ausência da *Applied Biosystems*, o *Taqman® Gene Expression Assay Pa03453400_s1*, cujos iniciadores e sondas anelam e amplificam uma região que inclui o gene viral UL132. Neste ensaio, os iniciadores e a sonda já vêm misturados nas seguintes concentrações: iniciadores a 900 nM e a sonda a 250 nM. O fluoróforo presente na sonda foi o FAM e o *quencher* foi do tipo não fluorescente, o MGB (*Minor Groove Binder*).

Os outros componentes da reação (dNTP, MgCl₂ e a Taq polimerase) estavam presentes no *Master Mix* utilizado, o *TaqMan Environmental Master Mix 2.0*, também da *Applied Biosystems*. A reação foi preparada com um volume final de 20,0 µL, e os volumes de cada reagente estão explicitados abaixo:

Sistema de reação da PCR em tempo real do HCMV:

| | |
|---------------------------|----------------|
| H ₂ O | 5,0 µL |
| Assay Pa03453400_s1 (20X) | 1,0 µL |
| Master Mix (2X) | 10,0 µL |
| DNA | 4,0 µL |
| Volume final | 20,0 µL |

As amostras foram distribuídas em placa apropriada para leitura óptica (*MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate*) da *Applied Biosystems*. A placa foi levada ao aparelho de PCR em tempo real *Step One™ Real Time PCR Systems*, da *Applied Biosystems*. As condições de termociclagem estão descritas no quadro 18.

Quadro 18 – Condições da PCR em tempo real para detecção do HCMV

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo | Reação |
|------------------|------------------|--------|------------------------|
| 1 | 95 | 5 min | Ativação da Polimerase |
| 40 | 95 | 15 seg | Desnaturação |
| | 60 | 60 seg | Anelamento/Extensão |

Ao final da reação, o resultado foi obtido a partir do programa *Step One™ Software v2.0*, instalado no computador acoplado à máquina de PCR em tempo real. As amostras foram feitas em cópia única, sempre com controles positivos e negativos presentes na placa, e, no caso das amostras positivas, a reação foi repetida em triplicata. As amostras foram consideradas positivas se o *cycle threshold* (CT) foi até 37.

4.3.6 – Detecção da *Chlamydia trachomatis* - Para detecção da bactéria *C. trachomatis* foi utilizado o par de iniciadores KL1/KL2 (MAHONY et al., 1992), que amplificam uma região de 241 pares de bases do plasmídeo bacteriano (quadro 19). O sistema da reação foi preparado com o volume final de 25,0 µL, conforme mostrado abaixo:

Quadro 19 – Iniciadores utilizados para detecção da CT

| Patógeno | Iniciadores | Sequência | Tamanho do amplicon |
|----------|-------------|----------------------------|---------------------|
| CT | KL1 | 5' TCCggAgCgAgTTACgAAgA 3' | 241 pb |
| | KL2 | 5'AATCAATgCCCgggATTggT 3' | |

Sistema de reação de PCR para os iniciadores KL1 e KL2:

| | |
|-----------------------------|----------------|
| H ₂ O | 13,4 µL |
| Tp 10x | 2,5 µL |
| MgSO ₄ 50mM | 1,0 µL |
| dNTP 10mM | 0,5 µL |
| KL1 5pmol | 2,5 µL |
| KL2 5pmol | 2,5 µL |
| Taq DNA polimerase (5U/µL)* | 0,1 µL |
| DNA | 2,5 µL |
| Volume final | 25,0 µL |

* Enzima Platinum Taq DNA polimerase High Fidelity (INVITROGEN)

A reação foi realizada em termociclador Veriti da Applied Biosystems. O programa de termociclagem para detecção da *C. trachomatis* pelos iniciadores KL1/KL2 está descrito abaixo (quadro 20):

Quadro 20 – Condições da PCR para detecção da CT através dos iniciadores KL1/KL2

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo | Reação |
|------------------|------------------|--------|----------------------|
| 1 | 94 | 30 seg | Desnaturação inicial |
| 40 | 94 | 30 seg | Desnaturação |
| | 64 | 30 seg | Anelamento |
| | 68 | 2 min | Extensão |
| 1 | 68 | 5 min | Extensão final |

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo (1µg/µL) (LGC Biotecnologia) ou *Gel Red* (*Uniscience*), para visualização com o auxílio de um transiluminador e fotodocumentação.

4.3.7. Detecção da *Neisseria gonorrhoeae*

Os iniciadores para a detecção da *N. gonorrhoeae* utilizados neste estudo foram desenvolvidos por Whiley et al., (2004) e suas sequências estão descritas no quadro 21. Este par de iniciadores amplificam uma porção do pseudogene *porA* bacteriano.

Quadro 21 – Iniciadores utilizados para detecção da NG

| Patógeno | Iniciadores | Sequência | Tamanho do amplicon |
|----------|--------------|---|---------------------|
| NG | PapF PapR | 5' CggTTTCCgTgCgTTACgA 3' 5' CTggTTTCATCTgATTACTTTCCA 3' | 132 pb |

Apesar deste ensaio ter sido originalmente desenhado para uma reação em tempo real, os iniciadores foram utilizados para uma reação de PCR normal, com mudanças nos tempos de desnaturação, anelamento e extensão, e no número de ciclos para otimização da reação. Adaptações foram feitas também em relação aos volumes e concentrações dos reagentes. Os tempos e temperaturas estão descritos no quadro 22, e os volumes da reação estão especificados abaixo:

Sistema de reação de PCR para os iniciadores PapF e PapR:

| | |
|-----------------------------|----------------|
| H ₂ O | 13,6 µL |
| Tp 10x | 2,5 µL |
| MgCl ₂ 50mM | 0,8 µL |
| dNTP 10mM | 0,5 µL |
| Pap F 5pmol | 2,5 µL |
| PapR 5pmol | 2,5 µL |
| Taq DNA polimerase (5U/µL)* | 0,1 µL |
| DNA | 2,5 µL |
| Volume final | 25,0 µL |

* Enzima Platinum Taq DNA polimerase (INVITROGEN)

Quadro 22 – Condições da PCR para detecção da NG através dos iniciadores PapF/PapR

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo | Reação |
|------------------|------------------|--------|----------------------|
| 1 | 95 | 5 min | Desnaturação inicial |
| 35 | 95 | 30 seg | Desnaturação |
| | 55 | 30 seg | Anelamento |
| | 72 | 30 seg | Extensão |
| 1 | 72 | 5 min | Extensão final |

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo (1µg/µL) (LGC Biotecnologia) ou *Gel Red* (*Uniscience*), para visualização com o auxílio de um transiluminador e fotodocumentação.

4.3.8 – Detecção do *Trichomonas vaginalis*

Para detecção do *T. vaginalis* foi realizada uma PCR *Touch-Down* utilizando o par de iniciadores BTUB2/BTUB9, desenvolvidos por Madico et al., (1998). Estes iniciadores anelam em uma região bem conservada do gene beta-tubulina do *T. vaginalis*. A sequência dos iniciadores está descrita no quadro 23. Os tempos e

temperaturas da reação estão descritos no quadro 24. A reação foi preparada para um volume final de 25µL e os volumes e concentrações dos reagentes estão especificados abaixo.

Sistema de reação para os iniciadores BTUB2 e BTUB9:

| | |
|-----------------------------|----------------|
| H ₂ O | 16,6 µL |
| Tp 10x | 2,5 µL |
| MgCl ₂ 50mM | 0,8 µL |
| dNTP 10mM | 0,5 µL |
| BTUB2 5pmol | 1,0 µL |
| BTUB9 5pmol | 1,0 µL |
| Taq DNA polimerase (5U/µL)* | 0,1 µL |
| DNA | 2,5 µL |
| Volume final | 25,0 µL |

* Enzima Platinum Taq DNA polimerase (INVITROGEN)

Quadro 23 – Iniciadores utilizados para detecção do TV

| Patógeno | Iniciadores | Sequência | Tamanho do amplicon |
|----------|-------------|---------------------------------|---------------------|
| TV | BTUB 9 | 5' CATTgATAACGAAgCTCTTTACgAT 3' | 112 pb |
| | BTUB 2 | 5' gCATgTTgTgCCggACATAACCAT 3' | |

Quadro 24 – Condições da PCR para detecção do TV pelos iniciadores BTU2/BTUB9

| Número de ciclos | Temperatura (°C) | Tempo (seg.) | Reação |
|------------------|------------------|--------------|----------------------|
| 1 | 95 | 75 | Desnaturação inicial |
| 4 | 95 | 45 | Desnaturação |
| | 62 | 45 | Anelamento |
| | 72 | 60 | Extensão |

| | | | |
|----|-----------|-----|--------------|
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 61 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 90 | Extensão |
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 60 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 59 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 58 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 57 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 56 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 55 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 54 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |
| 4 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 53 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |
| 20 | 96 | 10 | Desnaturação |
| | 52 | 15 | Anelamento |
| | 60 | 120 | Extensão |

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (LGC Biotecnologia) ou *Gel Red* (*Uniscience*), para visualização com o auxílio de um transiluminador e fotodocumentação.

4.4 – Análise estatística

Os dados foram inicialmente tabulados em banco de dados criado no programa *Excel* da *Microsoft Office* para *Windows*, e após foram gerados bancos de dados que foram analisados através do software *Epi-Info 3.5.3* para *Windows* (programa desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo *Center of Disease Control and Prevention* (CDC) (www.cdc.gov.br)).

Os resultados estão apresentados por meio de tabelas e gráficos, sendo que na análise das variáveis quantitativas, quando os dados apresentavam distribuição normal, foi calculada a média e o desvio-padrão (DP) e na rejeição da hipótese de normalidade, o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Na análise das variáveis categóricas, foram calculadas as frequências absolutas simples e relativas e em alguns casos o Intervalo de Confiança ao nível de 95%. Na análise dos dados categóricos foi calculado o teste do qui-quadrado de *Pearson*, sendo que na impossibilidade da aplicação do teste de *Pearson* foi aplicado o teste exato de *Fisher* (VIEIRA, 2004; ARANGO, 2001). O nível de significância fixado na aplicação dos testes foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 – Caracterização geral da amostra

Foram arroladas nesta pesquisa 361 mulheres atendidas nas UBS do município de Coari, que atendiam aos critérios de inclusão deste estudo. Todas foram esclarecidas quanto aos objetivos e aceitaram participar através da assinatura do TCLE. O sigilo das informações foi garantido e o tempo médio das entrevistas foi de 30 minutos.

As informações advindas do questionário sócio-demográfico e comportamental revelaram que a idade das mulheres participantes deste estudo variou de 18 a 78 anos, com média de idade de 36,4 anos (DP=13,4). Os dados a respeito da procedência dessas mulheres mostraram que a maioria delas (quase 70%) era natural da cidade de Coari. Estas informações estão detalhadas na tabela 1.

Quanto ao grau de escolaridade, as mulheres apresentaram predominantemente um baixo nível de escolaridade, com 44% delas apresentando ensino fundamental incompleto. Apenas 4,2% apresentaram ensino superior completo. Cerca de 46,5% das mulheres trabalhavam, sendo as principais ocupações citadas: agente administrativo, agricultora, professora, comerciante e auxiliar de serviços gerais. A renda familiar de 1 salário mínimo foi relatada por 36% das mulheres, e a renda de 2 a 3 salários mínimos foi relatada por 35,5% delas. Estas informações estão detalhadas na tabela 1.

Todas as mulheres arroladas nesta pesquisa disseram-se sexualmente ativas. A grande maioria delas (77,3%) era casada ou vivia em união estável. Cinco mulheres (1,4%) estavam grávidas. A quantidade de gestações dessas mulheres variou entre 0 e 18, com mediana quatro (4). A quantidade de filhos nascidos vivos variou entre 0 e 16, com mediana três (3). Nas questões relativas a aborto, 142 (39,3%) mulheres referiram ter passado por esta experiência. Destas, 133 referiram aborto espontâneo e 16 referiram aborto provocado (7 mulheres referiram ter tido os dois tipos). Estas informações estão detalhadas na tabela 2.

Tabela 1 – Distribuição segundo a frequência das variáveis econômicas e sócio-demográficas das mulheres amostradas no município de Coari/AM

| Variáveis (n = 361) | f_i | % |
|---|----------------------|----------|
| Idade | | |
| 18 --- 25 | 70 | 19,3 |
| 25 --- 35 | 128 | 35,4 |
| 35 --- 45 | 71 | 19,7 |
| 45 --- 55 | 50 | 14,9 |
| 55 --- 65 | 26 | 7,2 |
| ≥ 65 | 16 | 4,4 |
| Média ± DP | 36,4 ± 13,4 | |
| Amplitude | 18 - 78 | |
| Naturalidade | | |
| Coari | 252 | 69,8 |
| Outros municípios do Estado do Amazonas | 84 | 23,3 |
| Manaus | 18 | 5,0 |
| Outros municípios do Brasil | 7 | 1,9 |
| Escolaridade | | |
| Ensino fundamental incompleto | 159 | 44,0 |
| Ensino fundamental completo | 65 | 18,0 |
| Ensino médio completo | 122 | 33,8 |
| Ensino superior completo | 15 | 4,2 |
| Trabalha | | |
| Sim | 168 | 46,5 |
| Não | 193 | 53,5 |
| Ocupação (n = 168) | | |
| Agente administrativo | 28 | 16,7 |
| Agricultora | 27 | 16,1 |
| Professora | 22 | 13,1 |
| Comerciante | 21 | 12,5 |
| Auxiliar de serviços gerais | 18 | 10,7 |
| Doméstica | 12 | 7,1 |
| Outros | 40 | 23,8 |
| Renda familiar | | |
| Menos de um salário mínimo | 62 | 17,2 |
| Um salário mínimo | 130 | 36,0 |
| Dois a três salários mínimos | 128 | 35,5 |
| Acima de três salários mínimos | 41 | 11,3 |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio - padrão.

Tabela 2 – Distribuição segundo a frequência do estado conjugal e dados gestacionais das mulheres amostradas no município de Coari-AM

| Variáveis (n = 361) | f_i | % |
|--------------------------------------|--------|------|
| Estado civil | | |
| Solteira | 45 | 12,5 |
| Casada / União estável | 279 | 77,3 |
| Divorciada / Separada / Viúva | 37 | 10,2 |
| Grávida atualmente | | |
| Sim | 5 | 1,4 |
| Não | 356 | 98,6 |
| Quantidade de gestações | | |
| Mediana | 4,0 | |
| Amplitude | 0 – 18 | |
| Quantos filhos nascidos vivos | | |
| Mediana | 3,0 | |
| Amplitude | 0 - 16 | |
| Já sofreu aborto (n = 361) | | |
| | 142 | 39,3 |
| Quantos espontâneos (n = 133) | | |
| Um | 97 | 72,9 |
| Dois | 23 | 17,3 |
| Três | 13 | 9,8 |
| Quantos provocados (n = 16) | | |
| Um | 10 | 62,5 |
| Dois | 5 | 31,2 |
| Três | 1 | 6,3 |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio - padrão.

As informações relativas ao comportamento sexual destas mulheres mostraram que a idade da primeira relação sexual variou entre 11 e 29 anos, com média de idade de 15,9 (DP=2,5). Sobre a quantidade de parceiros sexuais ao longo de toda a vida, a maioria das mulheres relatou ter tido entre 1 a 5 parceiros (78,7%). Quando perguntadas a respeito da quantidade de parceiros sexuais fixos nos últimos 12 meses, 326 mulheres (90,3%) responderam ter tido entre 1 e 3 parceiros fixos. Quando questionadas sobre o uso do preservativo com os parceiros fixos, as mulheres responderam “não usar nunca” (57,2%), “nem sempre/raramente (23,8%)” e “sempre (19%)” (Tabela 3). Os motivos mais citados para o não uso consistente de preservativos com os parceiros fixos foram: “confiança no parceiro”, “parceiro não gosta” e “uso de outro método anticoncepcional”.

Tabela 3 – Distribuição segundo a frequência e comportamento sexual das mulheres amostradas no município de Coari-AM

| Variáveis (n = 361) | f_i | % |
|---|----------------------|----------|
| Idade da primeira relação sexual | | |
| Média ± DP | 15,9 ± 2,5 | |
| Amplitude | 11 - 29 | |
| Número de parceiros sexuais ao longo da vida | | |
| 1 a 5 | 284 | 78,6 |
| 6 a 10 | 49 | 13,6 |
| Acima de 10 | 28 | 7,8 |
| Quantidade de parceiros fixos nos últimos 12 meses | | |
| Nenhum | 34 | 9,4 |
| Um a três | 326 | 90,3 |
| Mais de três | 1 | 0,3 |
| Quantidade de parceiros eventuais nos últimos 12 meses | | |
| Nenhum | 329 | 91,1 |
| Um a três | 28 | 7,7 |
| Mais de três | 4 | 1,1 |
| Uso de preservativo com parceiro fixo (n = 327) | | |
| Sempre | 62 | 19,0 |
| Nem sempre/Raramente | 78 | 23,8 |
| Nunca | 187 | 57,2 |
| Uso de preservativo com parceiro eventual (n = 32) | | |
| Sempre | 25 | 78,1 |
| Nem sempre | 5 | 15,6 |
| Nunca | 2 | 6,3 |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio - padrão.

Em relação à quantidade de parceiros sexuais eventuais, a grande maioria (91,1%) respondeu não ter tido nenhum parceiro eventual. Das 32 mulheres (8,9%) que relataram ter tido relações sexuais com parceiro eventuais, observou-se uso mais frequente de preservativo, com 78,1% das mulheres relatando que usavam “sempre”, 15,6% “nem sempre” e 6,3% “nunca” (tabela 3). O motivo mais citado pelas que não usavam consistentemente o preservativo foi “muitas vezes não tem”.

A história clínica dessas mulheres também foi analisada. Das 361 mulheres, 321 (88,9%) já tinham realizado o teste para detecção do vírus da AIDS, principalmente durante o exame pré-natal ou durante campanhas municipais. Porém, dessas mulheres, 131 não sabiam dizer o resultado do exame, e das 190

mulheres que sabiam dizer o resultado do exame, 2 delas (1%) disseram-se HIV-positivas. Estas informações estão detalhadas na tabela 4.

As pacientes do estudo também foram questionadas quanto a presença de DST no momento da coleta ou no passado. Em relação à infecção atual, 7 mulheres (1,9%) disseram ser atualmente portadora de alguma DST, que foram: tricomoníase (n=4), HPV (n=1), hepatite B (n=1) e herpes genital (n=1). Porém, 18 mulheres (5%) revelaram ter tido alguma outra DST no passado, que foram: tricomoníase (n=9), hepatite B (n=3), sífilis (n=2), HPV (n=2), herpes genital (n=1) e gonorréia (n=1). Quando perguntadas em relação à ocorrência prévia de DST em seus parceiros, 19 mulheres (5,3%) disseram ter se relacionado nos últimos 12 meses com homens que tiveram DST no passado. Estas informações estão detalhadas na tabela 4.

Quando questionadas a respeito de outros fatores de risco, foi encontrado que 9,7% delas possuíam tatuagem e 11,9% apresentavam-se em situação de risco ocupacional (trabalhavam em Unidade de Saúde, tais como hospital, posto de saúde, laboratório e consultório odontológico) (tabela 5). Nenhuma delas afirmou já ter usado drogas injetáveis nem ter se relacionado com parceiro que o tivesse feito.

Com relação às queixas clínicas apresentadas pelas mulheres, foi encontrado que 197 mulheres (54,6%) estavam completamente assintomáticas e 159 (44%) apresentavam queixas clínicas, por vezes mais de uma. As principais queixas clínicas relatadas foram: dor pélvica (105 mulheres), corrimento vaginal (95 mulheres), prurido (48 mulheres) e dificuldade de urinar (38 mulheres) (Tabela 5).

Tabela 4 – Distribuição segundo a frequência sobre os dados de HIV e DST de mulheres amostradas no município de Coari - AM

| Variáveis (n = 361) | f_i | % |
|---|----------------------|----------|
| Já realizou teste para detecção do HIV | 231 | 64,0 |
| Resultado positivo para HIV (n = 190) | 2 | 1,0 |
| Portadora de DST | 7 | 1,9 |
| Qual (n = 7) | | |
| Tricomoníase | 4 | 57,1 |
| HPV | 1 | 14,3 |
| Hepatite B | 1 | 14,3 |
| Herpes genital | 1 | 14,3 |
| Já teve alguma DST no passado | 18 | 5,0 |
| Qual (n = 18) | | |
| Tricomoníase | 9 | 50,0 |
| Hepatite B | 3 | 16,7 |
| Sífilis | 2 | 11,1 |
| HPV | 2 | 11,1 |
| Herpes genital | 1 | 5,6 |
| Gonorréia | 1 | 5,6 |
| Relacionamento nos últimos 12 meses com parceiro que já teve DST | 19 | 5,3 |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio - padrão.

Tabela 5 – Distribuição segundo a frequência sobre os dados relativos aos fatores de risco e sintomatologia das mulheres amostradas no município de Coari - AM

| Variáveis (n = 361) | f_i | % |
|---|----------------------|----------|
| Possui tatuagem | 35 | 9,7 |
| Trabalha em Unidade de Saúde | 43 | 11,9 |
| Usa método anticoncepcional (exceto camisinha) | 185 | 51,2 |
| Motivo da consulta | | |
| Consulta de rotina para realização de preventivo | 187 | 51,8 |
| Apresentação de queixas clínicas | 172 | 47,6 |
| Outros | 2 | 0,6 |
| Queixa clínica (n = 172)* | | |
| Dor pélvica | 105 | 61,0 |
| Corrimento vaginal | 95 | 55,2 |
| Coceira | 48 | 27,9 |
| Dificuldade de urinar | 38 | 22,1 |
| Outras | 8 | 4,7 |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio - padrão. *Não se soma pois pode ocorrer mais de uma queixa clínica.

5.2 – Resultados citológicos

Das 361 mulheres envolvidas neste estudo, o resultado da citologia pode ser obtido em 321 delas. As lâminas das outras 40 mulheres apresentaram-se inadequadas para leitura (amostra insatisfatória). Destas 321 amostras satisfatórias, 97,8% delas apresentaram achados citológicos compatíveis com normalidade, 1,2% apresentaram Atipias Escamosas de Significado Indeterminado (ASCUS), 0,3% apresentou Lesão Escamosa de Baixo Grau (LSIL) e 0,6% apresentou Lesão Escamosa de Alto Grau (HSIL), conforme mostra a tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição segundo a frequência do achados na citologia oncótica em mulheres amostradas no município de Coari - AM

| Citologia Neoplasia (n = 321) | f_i | % | IC95% |
|---|----------------------|----------|--------------|
| Normal | 314 | 97,8 | 95,4 – 99,0 |
| ASCUS | 4 | 1,2 | 0,4 – 3,4 |
| Lesão epitelial de alto grau (NIC II e III) | 2 | 0,6 | 0,1 – 2,5 |
| Lesão epitelial de baixo grau (NIC I e HPV) | 1 | 0,3 | 0,0 – 2,0 |

IC95% = Intervalo de Confiança ao nível de 95%.

5.3 – Resultados Moleculares

Todas as amostras foram positivas na primeira PCR para detecção do DNA genômico humano. As reações para detecção dos patógenos revelaram que 173 mulheres (47,8%) estavam infectadas com algum dos patógenos estudados. A prevalência foi de 29,1% de infecção pelo HPV, 12,7% de infecção pelo *Trichomonas vaginalis*, 8,3% de infecção pelo Citomegalovírus Humano, 6,4% de infecção pela *Chlamydia trachomatis*, 1,4% de infecção pela *Neisseria gonorrhoeae* e 0,6% de infecção pelo Herpes Simples 2, conforme mostra a tabela 7.

Os tipos de HPV mais encontrados foram o HPV 16 (58,1%), seguido pelo HPV 58 (20%) e pelo HPV 33 (6,7%). Outros tipos encontrados foram: HPV 81, HPV 6, HPV 70, HPV 31, HPV 35, HPV 45, HPV 52, HPV 53, HPV 61, HPV 68, HPV 71 e HPV 89, conforme mostra o figura 5.

Tabela 7 – Distribuição segundo a prevalência dos patógenos detectados nas mulheres amostradas no município de Coari - AM

| Patógenos (n = 361) | f _i | % | IC95% |
|------------------------------|----------------|------|-------------|
| HPV | 105 | 29,1 | 24,5 – 34,1 |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | 46 | 12,7 | 9,6 – 16,7 |
| Citomegalovírus humano | 30 | 8,3 | 5,8 – 11,8 |
| <i>Chlamydia trachomatis</i> | 23 | 6,4 | 4,2 – 9,5 |
| <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | 5 | 1,4 | 0,5 – 3,4 |
| Herpes Simples tipo 2 | 2 | 0,6 | 0,1 – 2,2 |

IC95% = Intervalo de Confiança ao nível de 95%.

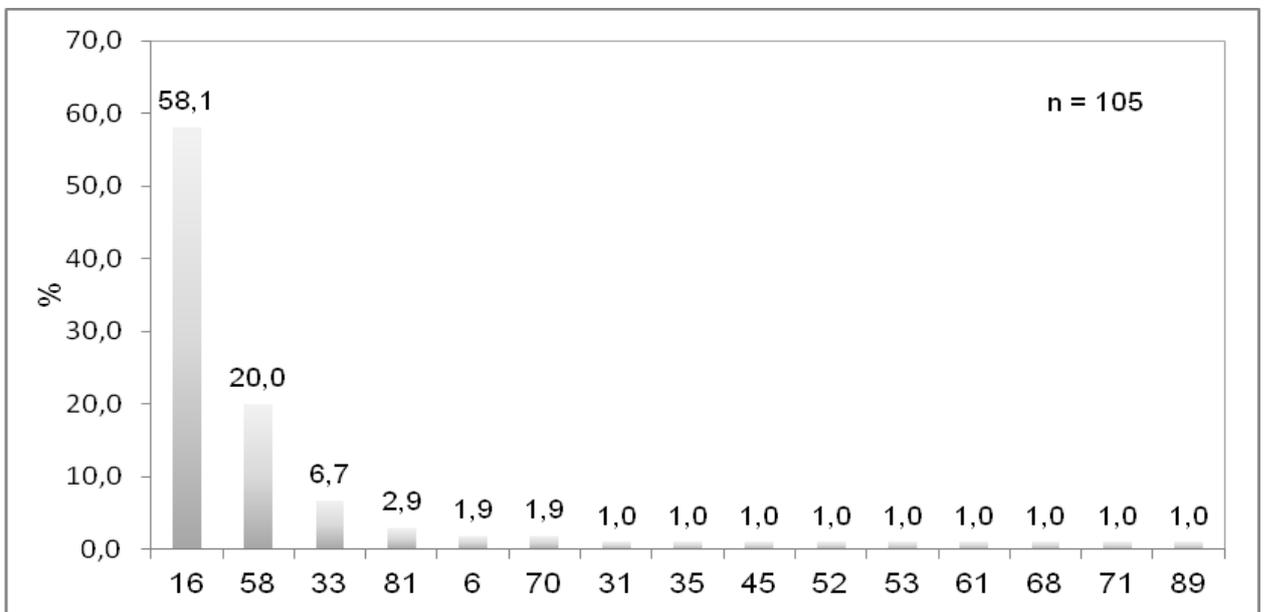


Fig 5 – Distribuição segundo a frequência dos tipos de HPV diagnosticados nas mulheres amostradas na cidade de Coari - AM

A figura 6 exemplifica a detecção do DNA genômico. As figuras 7 a 10 exemplificam o detecção dos patógenos estudados através da PCR convencional, e as figuras 11 e 12 exemplificam a detecção dos patógenos estudados através da PCR em tempo real.

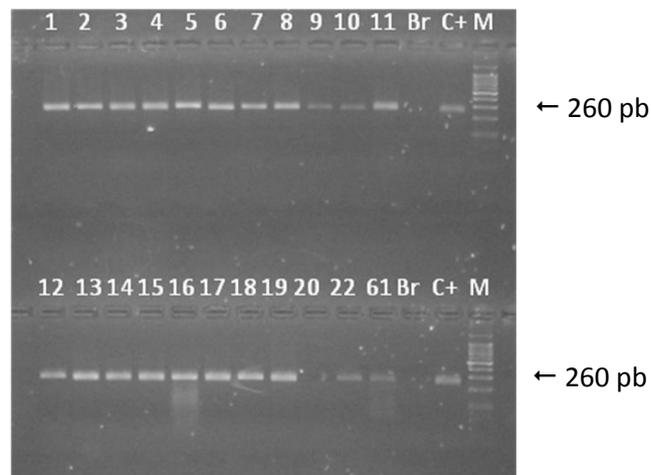


Fig. 6 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$), evidenciando um fragmento de 260pb resultante da amplificação por PCR da região microssatélite $(\text{GATA})_{13}$ do cromossomo 15 humano. Amostras 1 a 20, 22 e 61, correspondentes a esfregaços obtidos da junção escamo-colunar (JEC). Br = Controle negativo; C+ = Controle positivo; M = marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).



Fig. 7 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) evidenciando fragmento de 450pb resultante da amplificação por PCR do gene L1 do HPV, utilizando os iniciadores MY09 e MY11. Amostras 255 a 260 correspondentes a esfregaços obtidos da junção escamo-colunar. Br = Controle negativo; C+ = Controle positivo; M= marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

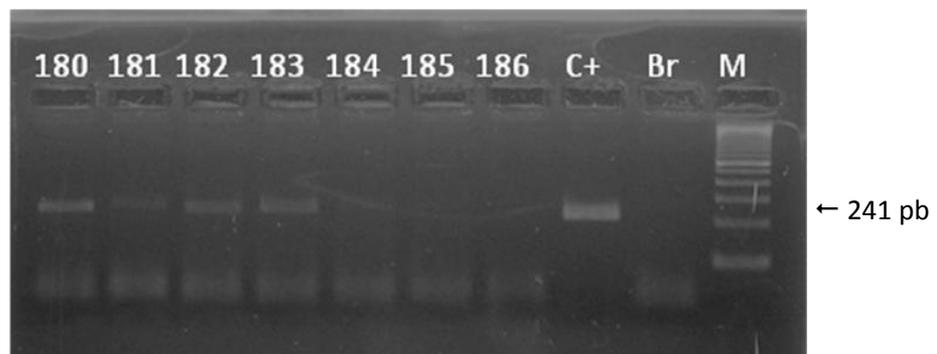


Fig. 8 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0%, corado com *Gel Red*, evidenciando um fragmento de 241pb resultante da amplificação por PCR de uma região do plasmídeo críptico bacteriano da *C. trachomatis*, utilizando os iniciadores KL1 e KL2. Amostras 180 a 186 correspondentes a esfregaços obtidos da junção escamo-colunar. Br = Controle negativo; C+ = Controle positivo; M= marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

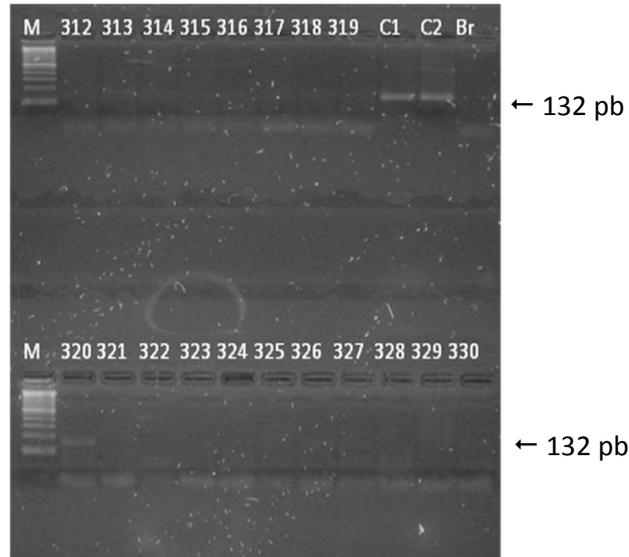


Fig. 9 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0%, corado com *Gel Red*, evidenciando um fragmento de 132pb resultante da amplificação por PCR do pseudogene *porA* da *N. gonorrhoeae*, utilizando os iniciadores PapF e PapR. Amostras 312 a 330 correspondentes a esfregaços obtidos da junção escamo-colunar. Br = Controle negativo; C1 = Controle positivo 1; C2 = Controle positivo 2; M= marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

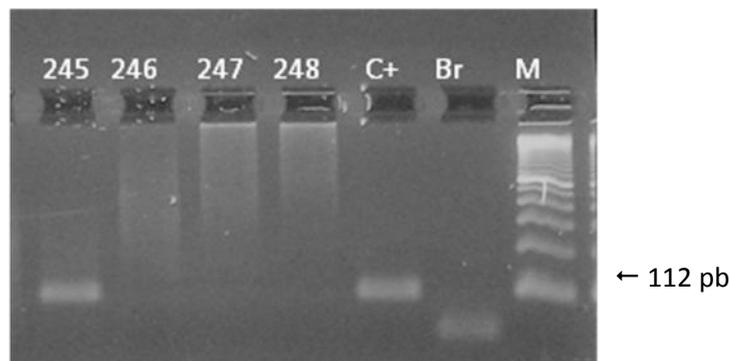
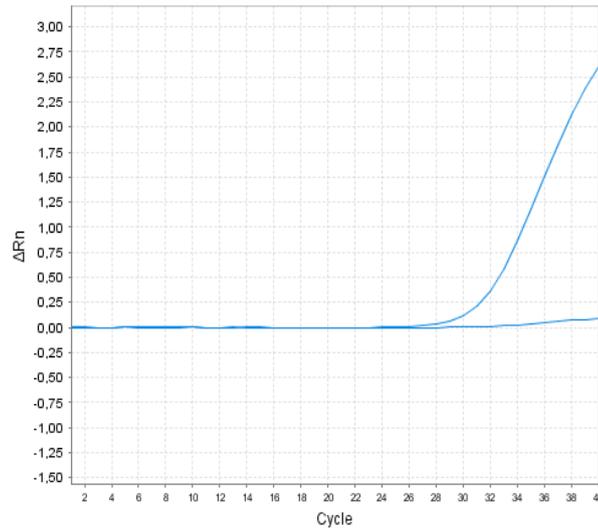
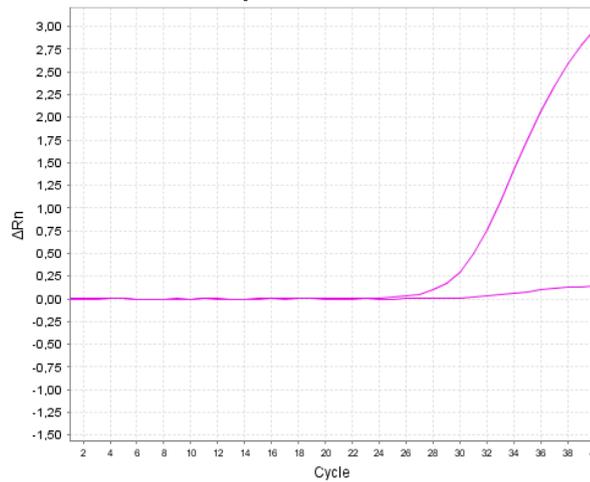


Fig. 10 – Perfil eletroforético em gel de agarose a 2,0% corado com *Gel Red*, evidenciando um fragmento de 112pb resultante da amplificação por PCR Touch-down do gene da betatubulina do *T. vaginalis*, utilizando os iniciadores BTUB2 e BTUB9. Amostras 245 a 248, correspondentes a esfregaços obtidos da junção escamo-colunar. Br = Controle Negativo; C+ = Controle positivo; M= marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen).

Amostra 26 – CT = 30

Amplification Plot

Controle positivo – CT = 26

Amplification Plot

Controle negativo

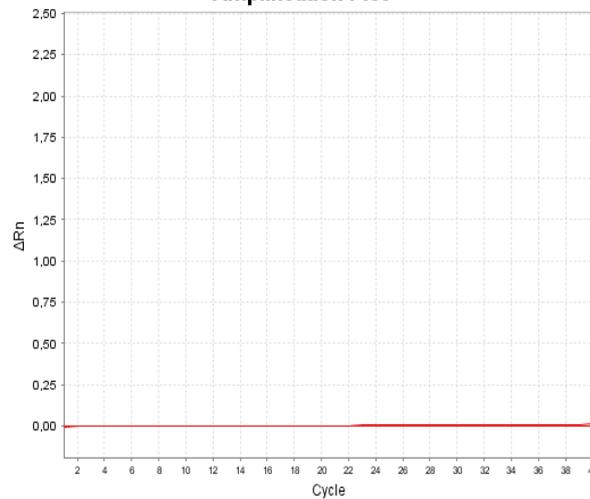
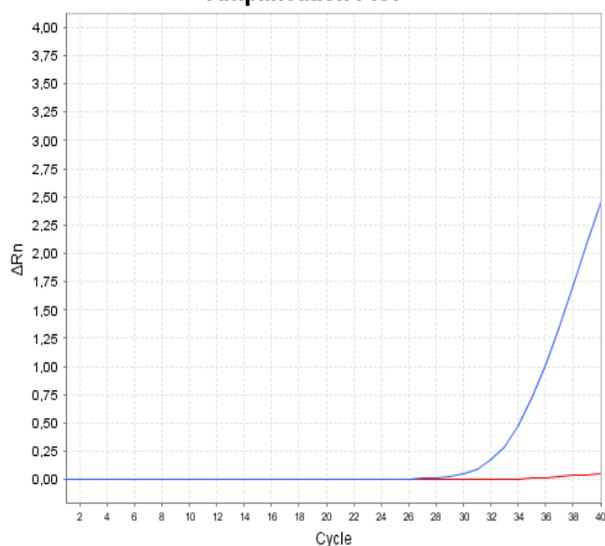
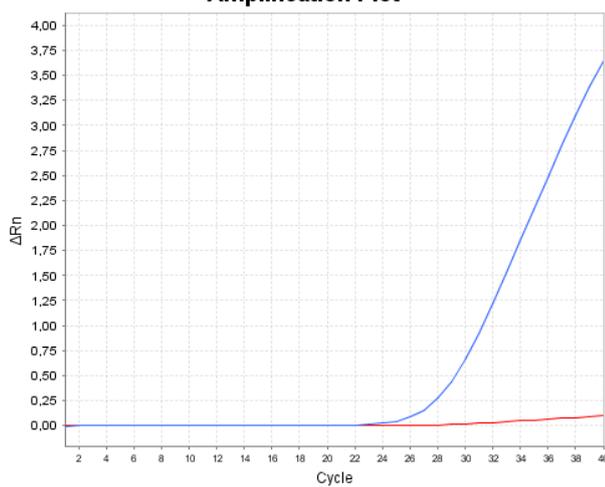
Amplification Plot

Fig. 11 – Gráficos de amplificação de uma amostra positiva para Citomegalovírus Humano (Amostra 26, CT=30) e Controle Positivo (CT=29) detectadas através de PCR em Tempo Real, e Controle Negativo.

Amostra 7 – CT = 30

Amplification Plot

Controle positivo – CT = 26

Amplification Plot

Controle negativo

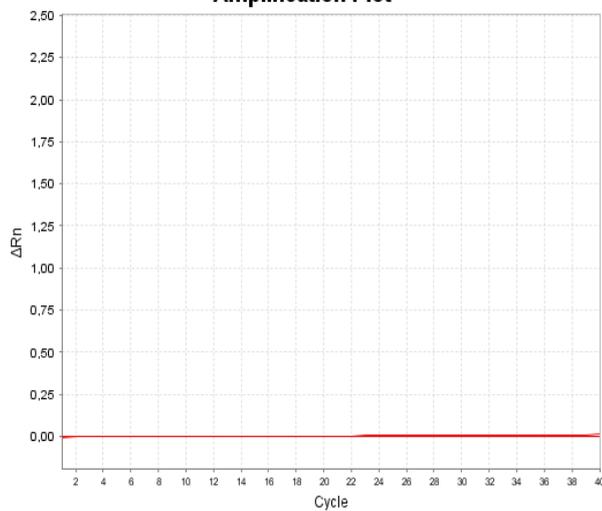
Amplification Plot

Fig. 10 – Gráficos de amplificação de uma amostra positiva para Herpes vírus Simples 2 (Amostra 7, CT=30) e Controle Positivo (CT=26) detectadas através de PCR em Tempo Real, e Controle Negativo.

Na tabela 8 está descrito o tipo viral encontrado nas amostras cervicais de mulheres estudadas no município de Coari/AM que apresentaram resultado citológico de ASCUS, LSIL e HSIL.

Tabela 8 – Tipos de HPV encontrados nas pacientes que apresentaram resultado citológico alterado (ASCUS, LSIL e HSIL) dentre as mulheres amostradas no município de Coari - AM

| Amostra | Citologia | Tipo viral |
|----------------|------------------|-------------------|
| 15 | ASCUS | 16 |
| 59 | ASCUS | 16 |
| 72 | ASCUS | 58 |
| 166 | ASCUS | - |
| 210 | LSIL | 33 |
| 24 | HSIL | - |
| 357 | HSIL | 16 |

ASCUS – Células atípicas de significado indeterminado; LSIL – Lesão intraepitelial de baixo grau; HSIL – Lesão intraepitelial de alto grau

Das duas mulheres que se disseram portadoras do HIV, uma delas estava infectada por HPV 31 e a outra estava infectada por HCMV. Foram encontrados 35 casos de co-infecções, sendo 10 casos de co-infecção por HPV e *T. vaginalis*; 9 casos de co-infecção por HPV e HCMV; 5 casos de co-infecção por *C. trachomatis* e *T. vaginalis*; 3 casos de co-infecção por *C. trachomatis* e HPV; 2 casos de co-infecção por HPV e HSV-2; 2 casos de co-infecção por *T. vaginalis* e HCMV; 1 caso de co-infecção por HCMV e *C. trachomatis* e 1 caso de co-infecção entre *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis*. Houve também 2 casos de tripla infecção: 1 caso de tripla infecção por *C. trachomatis*, *T. vaginalis* e HPV58 e 1 caso de tripla infecção por *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis* e HCMV. Os dados relativos às co-infecções estão mostrados na tabela 9.

Tabela 9 – Dados de co-infecção encontrados nas mulheres amostradas na cidade de Coari/AM

| Amostra | HPV | HCMV | HSV-2 | CT | NG | TV |
|---------|--------|------|-------|----|----|----|
| 2 | HPV 16 | | | CT | | |
| 4 | HPV 16 | | | CT | | |
| 6 | HPV 16 | | HSV-2 | | | |
| 7 | HPV 16 | | HSV-2 | | | |
| 17 | HPV 16 | | | | | TV |
| 26 | HPV 16 | HCMV | | | | |
| 28 | HPV 16 | | | | | TV |
| 32 | HPV 16 | | | | | TV |
| 46 | | HCMV | | | | TV |
| 55 | HPV 16 | HCMV | | | | |
| 58 | HPV 16 | | | | | TV |
| 72 | HPV 58 | HCMV | | | | |
| 140 | HPV 16 | HCMV | | | | |
| 141 | HPV 68 | | | | | TV |
| 145 | HPV 16 | HCMV | | | | |
| 160 | HPV 81 | | | | | TV |
| 163 | HPV 58 | | | | | TV |
| 179 | | | | CT | | TV |
| 180 | HPV 81 | | | CT | | TV |
| 181 | | | | CT | | TV |
| 182 | | | | CT | | TV |
| 183 | | | | CT | | TV |
| 190 | HPV 6 | | | | | TV |
| 202 | | HCMV | | | | TV |
| 214 | HPV33 | HCMV | | | | |
| 221 | | | | CT | | TV |
| 234 | | HCMV | | | NG | TV |
| 246 | HPV 16 | | | | | TV |
| 249 | HPV 16 | | | | | TV |
| 254 | | | | | NG | TV |
| 269 | | HCMV | | CT | | |
| 274 | HPV 16 | HCMV | | | | |
| 289 | HPV 16 | HCMV | | | | |
| 335 | HPV 89 | | | CT | | |
| 365 | HPV 16 | HCMV | | | | |

HPV – Papilomavírus Humano; HCMV – Citomegalovírus Humano; HSV-2 – Herpes vírus simples 2;
 CT – *Chlamydia trachomatis*; NG – *Neisseria gonorrhoeae*; TV – *Trichomonas vaginalis*

5.4 – Associações entre variáveis

Os dados relativos a infecção por qualquer um dos patógenos sexualmente transmissíveis bem como por cada patógeno isoladamente (com exceção do HSV-2, devido a prevalência muito baixa) foram cruzados com os dados sócio-demográficos e comportamentais, tais como escolaridade, idade, número de parceiros, uso de preservativo, dentre outras variáveis. Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa entre nenhuma dessas variáveis e a infecção por qualquer um dos patógenos sexualmente transmissíveis (Tabela 10). Para cada patógeno particularmente, também não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre as variáveis estudadas e a infecção pelo patógeno (Tabelas 11 a 15). As principais queixas clínicas apresentadas pelas mulheres infectadas estão descritas na tabela 16.

Tabela 10 – Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação às mulheres amostradas na cidade de Coari/AM que apresentaram pelos menos uma infecção

| Variáveis (n = 361) | DST | | | | Total | p |
|---|----------------|------|----------------|------|-------|-----------|
| | Sim | | Não | | | |
| | f _i | % | f _i | % | | |
| Escolaridade | | | | | | 0,865* |
| Fundamental incompleto | 77 | 48,4 | 82 | 51,6 | 159 | |
| Fundamental completo | 96 | 47,5 | 106 | 52,5 | 202 | |
| Idade | | | | | | 0,671** |
| Média ± DP | 36,7 ± 14,0 | | 36,1 ± 12,9 | | | |
| Amplitude | 18 - 78 | | 18 - 73 | | | |
| Estado civil | | | | | | 0,668* |
| Solteira/Divorciada/Viúva | 41 | 50,0 | 41 | 50,0 | 82 | |
| Casada/União estável | 132 | 47,3 | 147 | 52,7 | 279 | |
| Número de parceiros na vida | | | | | | 0,605* |
| 1 a 5 | 140 | 49,3 | 144 | 50,7 | 284 | |
| 6 a 10 | 21 | 42,9 | 28 | 57,1 | 49 | |
| Acima de 10 | 12 | 42,9 | 16 | 57,1 | 28 | |
| Número de filhos | | | | | | 0,826**** |
| Mediana | 3,0 | | 3,0 | | | |
| Amplitude | 0 - 16 | | 0 - 12 | | | |
| Uso de preservativo com parceiro fixo (n = 327) | | | | | | 0,768* |
| Nem sempre | 127 | 47,9 | 138 | 52,1 | 265 | |
| Sempre | 31 | 50,0 | 31 | 50,0 | 62 | |
| Uso de preservativo com parceiro eventual (n = 32) | | | | | | 0,465*** |
| Nem sempre | 2 | 28,6 | 5 | 71,4 | 7 | |
| Sempre | 10 | 40,0 | 15 | 60,0 | 25 | |
| Tem /Já teve DST | | | | | | 0,466*** |
| Sim | 8 | 40,0 | 12 | 60,0 | 20 | |
| Não | 165 | 48,4 | 176 | 51,6 | 341 | |
| Parceiro com história de DST nos últimos 12 meses | | | | | | 0,371*** |
| Sim | 11 | 57,9 | 8 | 42,1 | 19 | |
| Não | 162 | 47,4 | 180 | 52,6 | 342 | |
| Motivo da consulta | | | | | | 0,175* |
| Consulta de rotina | 96 | 51,3 | 91 | 48,7 | 187 | |
| Queixas clínicas | 76 | 44,2 | 96 | 55,8 | 172 | |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste do qui-quadrado de Pearson; ** Teste t de Student; *** Teste exato de Fisher; **** Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 11 – Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação ao resultado do *Trichomonas vaginalis* nas mulheres amostradas no município de Coari - AM.

| Variáveis (n = 361) | Trichomonas vaginalis | | | | Total | p |
|---|-----------------------|------|----------------|-------|-------|-----------|
| | Positivo | | Negativo | | | |
| | f _i | % | f _i | % | | |
| Escolaridade | | | | | | 0,132* |
| Fundamental incompleto | 25 | 15,7 | 134 | 84,3 | 159 | |
| Fundamental completo | 21 | 10,4 | 181 | 89,6 | 202 | |
| Idade | | | | | | 0,175** |
| Média ± DP | 38,9 ± 15,2 | | 36,1 ± 13,1 | | | |
| Amplitude | 18 - 70 | | 18 - 78 | | | |
| Estado civil | | | | | | 0,866* |
| Solteira/Divorciada/Viúva | 10 | 12,2 | 72 | 87,8 | 82 | |
| Casada/União estável | 36 | 12,9 | 243 | 87,1 | 279 | |
| Número de parceiros na vida | | | | | | 0,357* |
| 1 a 5 | 34 | 12,0 | 250 | 88,0 | 284 | |
| 6 a 10 | 6 | 12,2 | 43 | 87,8 | 49 | |
| Acima de 10 | 6 | 21,4 | 22 | 78,6 | 28 | |
| Número de filhos | | | | | | 0,060**** |
| Mediana | 5,0 | | 3,0 | | | |
| Amplitude | 1 - 16 | | 0 - 14 | | | |
| Uso de preservativo com parceiro fixo (n = 327) | | | | | | 0,445* |
| Nem sempre | 35 | 13,2 | 230 | 86,8 | 265 | |
| Sempre | 6 | 9,7 | 56 | 90,3 | 62 | |
| Uso de preservativo com parceiro eventual (n = 32) | | | | | | 0,605*** |
| Nem sempre | - | - | 7 | 100,0 | 7 | |
| Sempre | 2 | 8,0 | 23 | 92,0 | 25 | |
| Tem /Já teve DST | | | | | | 0,481*** |
| Sim | 3 | 15,0 | 17 | 85,0 | 20 | |
| Não | 43 | 12,6 | 298 | 87,4 | 341 | |
| Parceiro com história de DST nos últimos 12 meses | | | | | | 0,079*** |
| Sim | 5 | 26,3 | 14 | 73,7 | 19 | |
| Não | 41 | 12,0 | 301 | 88,0 | 342 | |
| Motivo da consulta | | | | | | 0,858* |
| Consulta de rotina | 24 | 12,8 | 163 | 87,2 | 187 | |
| Queixas clínicas | 21 | 12,2 | 151 | 87,8 | 172 | |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste do qui-quadrado de Pearson; ** Teste t de Student; *** Teste exato de Fisher; **** Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 12 – Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação ao resultado do *Chlamydia trachomatis* nas mulheres amostradas no município de Coari - AM.

| Variáveis (n = 361) | Chlamydia trachomatis | | | | Total | p |
|---|-----------------------|------|----------------|-------|-------|-----------|
| | Positivo | | Negativo | | | |
| | f _i | % | f _i | % | | |
| Escolaridade | | | | | | 0,213* |
| Fundamental incompleto | 13 | 8,2 | 146 | 91,8 | 159 | |
| Fundamental completo | 10 | 5,0 | 192 | 95,0 | 202 | |
| Idade | | | | | | 0,394** |
| Média ± DP | 38,7 ± 15,8 | | 36,3 ± 13,2 | | | |
| Amplitude | 18 - 70 | | 18 - 78 | | | |
| Estado civil | | | | | | 0,153* |
| Solteira/Divorciada/Viúva | 8 | 9,8 | 74 | 90,2 | 82 | |
| Casada/União estável | 15 | 5,4 | 264 | 94,6 | 279 | |
| Número de parceiros na vida | | | | | | ***** |
| 1 a 5 | 16 | 5,6 | 268 | 94,4 | 284 | |
| 6 a 10 | 4 | 8,2 | 45 | 91,8 | 49 | |
| Acima de 10 | 3 | 10,7 | 25 | 89,3 | 28 | |
| Número de filhos | | | | | | 0,434**** |
| Mediana | 4,0 | | 3,0 | | | |
| Amplitude | 0 - 10 | | 0 - 16 | | | |
| Uso de preservativo com parceiro fixo (n = 327) | | | | | | 0,411*** |
| Nem sempre | 18 | 6,8 | 247 | 93,2 | 265 | |
| Sempre | 3 | 4,8 | 59 | 95,2 | 62 | |
| Uso de preservativo com parceiro eventual (n = 32) | | | | | | 0,648*** |
| Nem sempre | 1 | 14,3 | 6 | 85,7 | 7 | |
| Sempre | 3 | 12,0 | 22 | 88,0 | 26 | |
| Tem /Já teve DST | | | | | | 0,258*** |
| Sim | - | - | 20 | 100,0 | 20 | |
| Não | 23 | 6,7 | 318 | 93,3 | 341 | |
| Parceiro com história de DST nos últimos 12 meses | | | | | | 0,655*** |
| Sim | 1 | 5,3 | 18 | 94,7 | 19 | |
| Não | 22 | 6,4 | 320 | 93,6 | 342 | |
| Motivo da consulta | | | | | | 0,660* |
| Consulta de rotina | 13 | 7,0 | 174 | 93,0 | 187 | |
| Queixas clínicas | 10 | 5,8 | 162 | 94,2 | 172 | |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste do qui-quadrado de Pearson; ** Teste t de Student; *** Teste exato de Fisher; **** Teste não paramétrico de Mann-Whitney; ***** Não é possível aplicar a estatística de teste devido as restrições do qui-quadrado.

Tabela 13 – Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação ao resultado do *Neisseria gonorrhoeae* nas mulheres amostradas no município de Coari - AM.

| Variáveis (n = 361) | Neisseria gonorrhoeae | | | | Total | p |
|--|-----------------------|-----|----------------|-------|-------|----------|
| | Positivo | | Negativo | | | |
| | f _i | % | f _i | % | | |
| Escolaridade | | | | | | 0,611* |
| Fundamental incompleto | 2 | 1,3 | 157 | 98,7 | 159 | |
| Fundamental completo | 3 | 1,5 | 199 | 98,5 | 202 | |
| Idade | | | | | | 0,660** |
| Média ± DP | 33,8 ± 21,1 | | 36,5 ± 13,3 | | | |
| Amplitude | 18 - 69 | | 18 - 78 | | | |
| Estado civil | | | | | | 0,319* |
| Solteira/Divorciada/Viúva | 2 | 2,4 | 80 | 97,6 | 82 | |
| Casada/União estável | 3 | 1,1 | 276 | 98,9 | 279 | |
| Número de parceiros na vida | | | | | | **** |
| 1 a 5 | 4 | 1,4 | 280 | 98,6 | 284 | |
| 6 a 10 | - | - | 49 | 100,0 | 49 | |
| Acima de 10 | 1 | 2,6 | 27 | 96,4 | 28 | |
| Número de filhos | | | | | | 0,632*** |
| Mediana | 3,0 | | 3,0 | | | |
| Amplitude | 0 - 9 | | 0 - 16 | | | |
| Uso de preservativo com parceiro fixo (n = 327) | | | | | | 0,531* |
| Nem sempre | 3 | 1,1 | 262 | 98,9 | 265 | |
| Sempre | - | - | 62 | 100,0 | 62 | |
| Tem /Já teve DST | | | | | | 0,750* |
| Sim | - | - | 20 | 100,0 | 20 | |
| Não | 5 | 1,5 | 336 | 98,5 | 341 | |
| Parceiro com história de DST nos últimos 12 meses | | | | | | 0,762* |
| Sim | - | - | 19 | 100,0 | 19 | |
| Não | 5 | 1,5 | 337 | 98,5 | 342 | |
| Motivo da consulta | | | | | | 0,585* |
| Consulta de rotina | 2 | 1,1 | 185 | 98,9 | 187 | |
| Queixas clínicas | 3 | 1,7 | 169 | 98,3 | 172 | |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste do qui-quadrado de Pearson; ** Teste t de Student; *** Teste exato de Fisher; **** Teste não paramétrico de Mann-Whitney; ***** Não é possível aplicar a estatística de teste devido as restrições do qui-quadrado.

Tabela 14 – Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação ao resultado do Papilomavírus Humano nas mulheres amostradas no município de Coari - AM.

| Variáveis (n = 361) | Resultado do HPV | | | | Total | p |
|---|------------------|------|----------------|------|-------|-----------|
| | Positivo | | Negativo | | | |
| | f _i | % | f _i | % | | |
| Escolaridade | | | | | | 0,322* |
| Fundamental incompleto | 42 | 26,4 | 117 | 73,6 | 159 | |
| Fundamental completo | 63 | 31,2 | 139 | 68,8 | 202 | |
| Idade | | | | | | 0,668** |
| Média ± DP | 36,0 ± 13,2 | | 36,6 ± 13,5 | | | |
| Amplitude | 18 - 78 | | 18 - 73 | | | |
| Estado civil | | | | | | 0,967* |
| Solteira/Divorciada/Viúva | 24 | 29,3 | 58 | 70,7 | 82 | |
| Casada/União estável | 81 | 29,0 | 198 | 71,0 | 279 | |
| Número de parceiros na vida | | | | | | 0,199* |
| 1 a 5 | 86 | 30,3 | 198 | 69,7 | 284 | |
| 6 a 10 | 15 | 30,6 | 34 | 69,4 | 49 | |
| Acima de 10 | 4 | 14,3 | 24 | 85,7 | 28 | |
| Número de filhos | | | | | | 0,817**** |
| Mediana | 3,0 | | 3,0 | | | |
| Amplitude | 0 - 14 | | 0 - 16 | | | |
| Uso de preservativo com parceiro fixo (n = 327) | | | | | | 0,950* |
| Nem sempre | 78 | 29,4 | 187 | 70,6 | 265 | |
| Sempre | 18 | 29,0 | 44 | 71,0 | 62 | |
| Uso de preservativo com parceiro eventual (n = 32) | | | | | | 0,511*** |
| Nem sempre | 1 | 14,3 | 6 | 85,7 | 7 | |
| Sempre | 6 | 24,0 | 19 | 76,0 | 25 | |
| Tem /Já teve DST | | | | | | 0,549* |
| Sim | 7 | 35,0 | 13 | 65,0 | 20 | |
| Não | 98 | 28,7 | 243 | 71,3 | 341 | |
| Parceiro com história de DST nos últimos 12 meses | | | | | | 0,805* |
| Sim | 6 | 31,6 | 13 | 68,4 | 19 | |
| Não | 99 | 28,9 | 243 | 71,1 | 342 | |
| Motivo da consulta | | | | | | 0,592* |
| Consulta de rotina | 57 | 30,5 | 130 | 69,5 | 187 | |
| Queixas clínicas | 48 | 27,9 | 124 | 72,1 | 172 | |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste do qui-quadrado de Pearson; ** Teste t de Student; *** Teste exato de Fisher; **** Teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Tabela 15 – Distribuição segundo a frequência da história clínica em relação ao resultado do Citomegalovírus Humano nas mulheres amostradas no município de Coari - AM.

| Variáveis (n = 361) | Citomegalovírus humano | | | | Total | p |
|---|------------------------|------|----------------|-------|-------|-----------|
| | Positivo | | Negativo | | | |
| | f _i | % | f _i | % | | |
| Escolaridade | | | | | | 0,395* |
| Fundamental incompleto | 11 | 6,9 | 148 | 93,1 | 159 | |
| Fundamental completo | 19 | 9,4 | 183 | 90,6 | 202 | |
| Idade | | | | | | 0,078** |
| Média ± DP | 32,3 ± 14,0 | | 36,8 ± 13,3 | | | |
| Amplitude | 18 - 70 | | 18 - 78 | | | |
| Estado civil | | | | | | 0,590* |
| Solteira/Divorciada/Viúva | 8 | 9,8 | 74 | 90,2 | 82 | |
| Casada/União estável | 22 | 7,9 | 257 | 92,1 | 279 | |
| Número de parceiros na vida | | | | | | **** |
| 1 a 5 | 24 | 8,5 | 260 | 91,5 | 284 | |
| 6 a 10 | 3 | 6,1 | 46 | 93,9 | 49 | |
| Acima de 10 | 3 | 10,7 | 25 | 89,3 | 28 | |
| Número de filhos | | | | | | 0,111**** |
| Mediana | 2,0 | | 3,0 | | | |
| Amplitude | 0 - 14 | | 0 - 16 | | | |
| Uso de preservativo com parceiro fixo (n = 327) | | | | | | 0,259* |
| Nem sempre | 22 | 8,3 | 243 | 91,7 | 265 | |
| Sempre | 8 | 12,9 | 54 | 87,1 | 62 | |
| Uso de preservativo com parceiro eventual (n = 32) | | | | | | 0,523*** |
| Nem sempre | 1 | 14,3 | 6 | 85,7 | 7 | |
| Sempre | 2 | 8,0 | 23 | 92,0 | 25 | |
| Tem /Já teve DST | | | | | | 0,168*** |
| Sim | - | - | 20 | 100,0 | 20 | |
| Não | 30 | 8,8 | 311 | 91,2 | 341 | |
| Parceiro com história de DST nos últimos 12 meses | | | | | | 0,481*** |
| Sim | 2 | 10,5 | 17 | 89,5 | 19 | |
| Não | 28 | 8,2 | 314 | 91,8 | 342 | |
| Motivo da consulta | | | | | | 0,095* |
| Consulta de rotina | 20 | 10,7 | 167 | 89,3 | 187 | |
| Queixas clínicas | 10 | 5,8 | 162 | 94,2 | 172 | |

f_i = frequência absoluta simples; DP = desvio – padrão; * Teste do qui-quadrado de *Pearson*; ** Teste t de *Student*; *** Teste exato de *Fisher*; **** Teste não paramétrico de *Mann-Whitney*; ***** Não é possível aplicar a estatística de teste devido as restrições do qui-quadrado.

Tabela 16 – Queixas clínicas apresentadas pelas mulheres infectadas dentre as mulheres amostradas no município de Coari - AM.

| Queixas clínicas | HPV | HCMV | HSV-2 | CT | NG | TV |
|-------------------------|------------|-------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| Úlceras genitais | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dificuldade de urinar | 12 | 2 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| Corrimento vaginal | 27 | 7 | 2 | 5 | 3 | 10 |
| Prurido | 11 | 1 | 0 | 2 | 2 | 6 |
| Dor Pélvica | 26 | 6 | 0 | 7 | 2 | 14 |
| Outras | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |

HPV – Papilomavírus Humano; HCMV – Citomegalovírus Humano; HSV-2 – Herpes vírus simples 2; CT – *Chlamydia trachomatis*; NG – *Neisseria gonorrhoeae*; TV – *Trichomonas vaginalis*

6. DISCUSSÃO

Este foi um estudo de corte transversal, cujo principal interesse foi medir a prevalência da infecção por alguns patógenos sexualmente transmissíveis numa amostra da população feminina da cidade de Coari/AM. Em termos epidemiológicos, pode ser considerado um estudo de prevalência.

Os estudos de prevalência são muito importantes no contexto da saúde pública, pois através deles procura-se conhecer um atributo previamente selecionado em uma população (no caso, as doenças sexualmente transmissíveis) ou em uma amostra dela, que é mensurado em determinado ponto do tempo, sendo equivalente a se obter uma “fotografia” do problema (BRASIL, 2008).

À exceção das DST de notificação compulsória, são pouquíssimos os dados de incidência e prevalência do restante das DST em nível nacional. O conhecimento da prevalência dessas doenças no país advém de estudos regionais, que embora de limitado alcance geográfico individualmente, tomados em conjunto fornecem um panorama da situação brasileira.

Consciente dessa lacuna deixada pela falta de dados nacionais unificados, o Ministério da Saúde realizou um importante estudo sobre *“Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005”* (BRASIL, 2008), e uma das capitais selecionadas para esta pesquisa foi Manaus, capital do Amazonas (as outras capitais foram Goiânia, Fortaleza, São Paulo, Rio de Janeiro e Porto Alegre).

Na pesquisa supracitada, estudou-se a prevalência de algumas DST e os fatores de risco relacionados em 3 sub-populações, que foram: gestantes, homens trabalhadores de pequenas indústrias (esses dois sub-grupos representando populações feminina e masculina, respectivamente, sexualmente ativas, assintomáticas) e homens e mulheres que buscaram atendimento em clínicas de DST de centros de referência nas capitais estudadas. Esta pesquisa será de grande valor na discussão relativa a vários aspectos desse estudo aqui apresentado, principalmente nos aspectos relacionados às prevalências encontradas e métodos diagnósticos utilizados.

Como se pode verificar nas pesquisas epidemiológicas relacionadas ao tema realizadas no estado do Amazonas (seção 2.3 da Revisão de Literatura), os estudos encontrados foram todos realizados com amostras da população da cidade de Manaus. Dados relativos à população do interior do estado do Amazonas são praticamente desconhecidos.

A cidade de Coari é uma cidade estratégica na região central do Amazonas, sendo a quinta maior cidade do estado, com uma população de cerca de 67.000 habitantes (IBGE, 2009). Localiza-se na região do Médio Solimões, cerca de 363 km distante de Manaus. É uma das cidades mais ricas da região Norte em volume de recursos financeiros, recursos esses advindos principalmente dos *royalties* devidos à exploração de petróleo e gás natural pela Petrobras em suas terras.

A chegada de grande número de trabalhadores da Petrobras e das empresas do consórcio firmado para construção do gasoduto Coari-Manaus de várias regiões do país para a cidade de Coari intensificou-se nos últimos 10 anos, trazendo certo progresso à cidade. A grande maioria desses trabalhadores é do sexo masculino, e muitos desses homens foram morar em Coari solteiros ou sem o acompanhamento de suas famílias. Nesse contexto, mudanças no comportamento sexual da população (principalmente feminina) tendem a acontecer, e com isso há uma maior tendência à disseminação de DST. Esta situação merece atenção, uma vez que a disseminação de DST acarreta consigo várias complicações para a vida das pessoas e para o sistema de saúde local, implicando no aumento dos custos em cuidado com a saúde.

A amostra desse estudo foi composta por mulheres sexualmente ativas, moradoras da cidade de Coari, e esta pesquisa propôs-se a investigar a prevalência da infecção por patógenos sexualmente transmissíveis nesta amostra de população. Embora não seja objetivo deste trabalho analisar minuciosamente o comportamento sexual dessas mulheres, algumas perguntas a respeito do assunto foram incluídas no questionário na tentativa de se encontrarem fatores de risco envolvidos no processo.

Foi decidido considerar sexualmente ativas todas as mulheres que já tivessem feito sexo na vida, em concordância com as recomendações de França Jr

et al., (2003) em pesquisa encomendada pelo Ministério da Saúde ao IBOPE, que diz:

A definição de atividade sexual deve ser comparável aos estudos brasileiros MS/CEBRAP e MS/IBOPE, assim como aos estudos internacionais. Para tanto, deve-se considerar elegível toda pessoa que tenha declarado ter tido relações sexuais na vida (respostas SIM/NÃO). Adicionalmente, devem ser coletadas informações sobre a atividade sexual nos últimos 6 meses e nos últimos 12 meses (respostas SIM/NÃO).

Neste estudo, foi seguida essa recomendação em relação à inclusão das mulheres ditas sexualmente ativas e foram coletadas informações adicionais sobre atividade sexual nos últimos 12 meses. Apesar de alguns estudos incluírem como sexualmente ativas pessoas que fizeram sexo nos últimos 6 ou 12 meses (MELGAÇO et al., 2011), a inclusão das mulheres que não necessariamente fizeram sexo neste período é totalmente recomendável quando não se está estudando apenas comportamento sexual, e sim, a prevalência de infecção por patógenos sexualmente transmissíveis (IGANSI, 2005, FREDIZZI et al., 2008; BARCELOS et al., 2008), uma vez que muitos deles causam infecções crônicas e problemas a longo prazo para a saúde da mulher.

6.1 – Caracterização geral da amostra

As mulheres arroladas nesta pesquisa variaram em idade entre 18 a 78 anos, com média de idade de 36,4 anos (DP=13,4). Alguns estudos de prevalência realizados no Brasil em amostras semelhantes a nossa (mulheres em exame ginecológico de rotina), também incluíram mulheres numa ampla faixa etária, como o estudo de Moyses et al., (2008) que incluiu mulheres entre 16 e 83 anos e o estudo de Fredizzi et al., (2008) cuja abrangência foi de mulheres entre 14 e 54 anos.

Todas as participantes deste estudo eram moradoras do município de Coari, sendo 69,8% das mulheres naturais desta cidade. Outras 23,3% eram procedentes de outros municípios do interior do Amazonas, perfazendo um total de 93,1% das mulheres, de forma que temos dados que exemplificam bem aspectos das mulheres interioranas.

Quanto ao grau de escolaridade, as mulheres apresentaram predominantemente um baixo nível de escolaridade, com 44,0% delas apresentando ensino fundamental incompleto. Juntando-se a esse número os 18,0% de mulheres que apenas concluíram o ensino fundamental, perfazendo um total de 62,0%, temos um percentual bastante elevado de mulheres com baixo nível de escolaridade na população feminina amostrada. Isso certamente se reflete no nível de conhecimentos relacionados às atitudes e práticas relativas ao risco de se adquirir DST.

Mesmo que o grau de escolaridade isoladamente não seja suficiente para indicar a condição socioeconômica, ela tem sido considerada como a medida que mais se aproxima como indicador de pobreza, aí englobados todos os aspectos de “pobreza” em que uma pessoa possa estar imersa. Quando avaliada a situação sócio-econômica através da renda familiar, constatamos que a maioria das mulheres (36,0%) vive em famílias com renda de 1 salário mínimo, seguido por 35,5% de mulheres que vivem com renda familiar de 2 a 3 salários mínimos.

Constatamos que quase a metade da população feminina amostrada (46,5%) trabalhava e as principais ocupações relatadas foram: agente administrativo, agricultora, professora, comerciante, auxiliar de serviços gerais e empregada doméstica. Esse número é bastante expressivo, acompanhando as mudanças na dinâmica das estruturas familiares nas últimas décadas. A força do incremento do dinheiro ganho pelas mulheres no contexto familiar trouxe consigo mudanças nos papéis sociais desempenhados por homens e mulheres numa casa, repercutindo-se esses efeitos no cuidado com o corpo e na saúde sexual da mulher (JIMÉNEZ et al., 2001). Porém, mais de 50% das mulheres desse estudo não trabalhavam, podendo este fator estar contribuindo para a reprodução de papéis tradicionais nas relações de gênero, interferindo na capacidade de negociação de práticas sexuais mais seguras para as mulheres.

As mulheres amostradas, em sua grande maioria (77,3%), disseram-se estar casadas ou vivendo em união estável com um companheiro, enquanto que as 22,7% restantes relataram estar solteiras, separadas/divorciadas ou viúvas (isto é, não estavam vivendo com um companheiro, embora pudessem ter parceiros sexuais fixos). Estar “solteira” (englobando aí mulheres solteiras e separadas/divorciadas)

era por si só um fator de risco para a aquisição de uma DST. Este conceito tem mudado totalmente desde que se observou que as mulheres são a população com AIDS que mais cresce no mundo, principalmente entre aquelas que se encontram em relacionamentos estáveis, o que é chamado de “feminização da epidemia de AIDS” (BRASIL, 2007), desaparecendo esse conceito de estar “solteiro” como um fator de risco.

Sobre os dados gestacionais, optamos por trazer como medida de tendência central o valor da mediana, por ser esta menos influenciada por valores extremos do que a média. Neste sentido, tivemos que, embora a amplitude do número de gestações entre as mulheres tenham variado de 0 a 18, o valor da mediana foi 4. Embora a amplitude do número de nascidos vivos entre as mulheres tenha sido de 0 a 16 filhos, a mediana foi 3.

Das mulheres arroladas neste estudo, encontramos um alto número ($n=142$; correspondente a 39,3%) de mulheres que já tinham passado pela experiência de pelo menos 1 aborto. Destas, 133 mulheres relataram ter tido aborto espontâneo, sendo que 97 mulheres (72,9%) disseram ter tido 1 aborto, 23 (17,3%) tiveram 2 abortos espontâneos e encontramos 13 mulheres (9,8%) que relataram 3 abortos espontâneos. Sem desconsiderar outras causas relacionadas a ocorrência de abortos espontâneos, sabemos que alguns patógenos sexualmente transmissíveis como a clamídia e o gonococo estão relacionados a estes eventos.

A idade da primeira relação sexual das mulheres deste estudo variou de 11 a 29 anos, com média de idade de 15,9 anos ($DP=2,5$). Esta média foi semelhante a encontrada em mulheres na cidade de Manaus (15,8 anos) no estudo multicêntrico realizado pelo Ministério da Saúde, tendo inclusive sido considerada bem abaixo da média nacional, que foi 16,5 anos (BRASIL, 2008).

Um dos fatores de risco mais consistentes para algumas infecções sexualmente transmissíveis é o alto número de parceiros sexuais, sejam eles fixos ou eventuais. Quando perguntadas a respeito do número de parceiros sexuais ao longo da vida, a grande maioria das mulheres (78,7%) relataram ter tido de 1 a 5 parceiros, 13,6% disseram ter tido entre 6 e 10 parceiros e 7,8% relataram ter tido acima de 10 parceiros sexuais.

Foram adicionadas informações a respeito do comportamento sexual das mulheres nos últimos 12 meses. Neste período, 90,3% delas afirmaram ter tido de 1 a 3 parceiros fixos, 9,4% delas afirmaram não ter tido nenhum parceiro fixo e apenas 1 mulher (0,3%) disse ter tido mais de 3 parceiros fixos. Quando perguntadas a respeito do uso do preservativo com os parceiros fixos, a grande maioria delas (57,2%) afirmou não usar “nunca”, 23,8% disseram usar “nem sempre/raramente” e 19% delas afirmaram “sempre” usar.

Os motivos mais citados para o não uso frequente de preservativo com os parceiros fixos foram: “confiança no parceiro”, “parceiro não gosta” e “uso de outro método anticoncepcional”. Aspectos culturais estão bem claros nestes motivos citados pelas mulheres. A “confiança no parceiro” está diretamente relacionada com a concepção cultural de que no relacionamento fixo está implicado um relacionamento afetivo, duradouro e exclusivo, sendo difícil que o preservativo seja negociado como meio de prevenção às DST. O “uso de outro método anticoncepcional” reforça este pensamento, pois mostra que as mulheres nem parecem cogitar uma outra finalidade do uso do preservativo que não a anticoncepção em seus relacionamentos fixos (JIMÉNEZ et al., 2001). O “parceiro não gosta” tem suas raízes nas relações de gênero (isto é, de poder entre os sexos). Em praticamente todas as sociedades, há claras diferenças nos papéis desempenhados por homens e mulheres. Historicamente, essas diferenças se expressam de forma desfavorável às mulheres. Esse poder diferenciador entre homens e mulheres amplia a vulnerabilidade feminina, pois prioriza o prazer sexual masculino em detrimento dos cuidados com o corpo e com a saúde da mulher (BRASIL, 2007).

Em relação à quantidade de parceiros sexuais eventuais, a grande maioria (90,8%) respondeu não ter tido nenhum parceiro eventual. Das 32 mulheres (9,2%) que relataram ter tido relações sexuais com parceiro eventuais, observou-se um uso mais frequente de preservativo, com 78,1% das mulheres relatando que usavam “sempre”, 15,6% “nem sempre” e 6,3% “nunca”. O motivo mais citado pelas que não usavam frequentemente o preservativo foi “muitas vezes não tem”. Enfatiza-se aí a questão do acesso ao preservativo, que mesmo em sistemas de saúde mais inclusivos, como o brasileiro, com distribuição gratuita nas UBS, as mulheres ainda podem ter certa dificuldade de consegui-los devido a questões como falta dos

preservativos na Unidade, dificuldade em conseguir uma consulta ou impossibilidade de conseguir na quantidade que gostaria.

A história de infecção prévia por algum patógeno sexualmente transmissível e principalmente o relacionamento com parceiros que já foram portadores de alguma DST no passado constituem fatores de risco muito bem estabelecidos (BRASIL, 2008). Em relação as DST (exceto HIV), 7 mulheres (1,9%) disseram ser atualmente portadoras de alguma, que foram: tricomoníase (n=4), HPV (n=1), hepatite B (n=1) e herpes genital (n=1). Porém, 18 mulheres (5,0%) revelaram ter tido alguma outra DST no passado, que foram: tricomoníase (n=9), hepatite B (n=3), sífilis (n=2), HPV (n=2), herpes genital (n=1) e gonorréia (n=1). Quando perguntadas em relação à ocorrência prévia de DST em seus parceiros, 19 mulheres (5,3%) disseram ter se relacionado nos últimos 12 meses com homens que tiveram DST no passado.

Mesmo que as mulheres participantes da pesquisa estivessem presentes à UBS para realização do exame preventivo de rotina, foram questionadas se estavam “apenas” para exame de rotina (isto é, se estavam completamente assintomáticas) ou se apresentavam queixas clínicas. Foi encontrado que 197 mulheres (54,6%) estavam completamente assintomáticas e 159 (44%) apresentavam queixas clínicas. As principais queixas clínicas relatadas foram: dor pélvica (105 mulheres), corrimento vaginal (95 mulheres), dificuldade de urinar (38 mulheres) e prurido (48 mulheres).

Quando questionadas a respeito de outros fatores de risco, foi encontrado que 9,7% delas possuíam tatuagem e 11,9% apresentavam-se em situação de risco ocupacional (trabalhavam em Unidade de Saúde, tais como hospital, posto de saúde, laboratório e consultório odontológico). Nenhuma delas afirmou já ter usado drogas injetáveis nem ter se relacionado com parceiro que o tivesse feito.

6.2 – Prevalência geral dos patógenos sexualmente transmissíveis

As reações para detecção dos patógenos revelaram que 173 mulheres (47,8%) estavam infectadas com pelo menos um dos patógenos estudados. Este número pode ser considerado alto. No estudo multicêntrico realizado pelo Ministério da Saúde em seis capitais brasileiras, a prevalência das DST analisadas (sífilis,

gonorréia, clamídia, HPV, hepatite B e HIV) foi de 42,0% para pelo menos um patógeno em mulheres gestantes (BRASIL, 2008).

Os dados relativos a infecção por qualquer um dos patógenos sexualmente transmissíveis foram cruzados com várias características sócio-demográficas e comportamentais. Observou-se que, em termos proporcionais, a infecção predominou em mulheres com baixo nível de escolaridade, que se disseram estar solteiras/separadas/divorciadas, em mulheres que disseram estar se relacionando com homens que já tiveram história de infecção prévia por DST, porém nenhuma dessas associações mostrou-se estatisticamente significativa.

Ao contrário do que poderíamos esperar, houve ligeiro predomínio (em termos proporcionais) também de infecções em mulheres que relataram ter tido de 1 a 5 parceiros sexuais ao longo da vida, que relataram uso frequente de preservativo tanto com parceiro fixo quanto o eventual, e que se apresentaram ao exame sem nenhuma queixa clínica (completamente assintomáticas). Nenhuma dessas associações, porém, mostrou-se estatisticamente significativa.

6.3 – Infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV mostrou-se bastante elevada entre as mulheres pertencentes a esta amostra. Quase 30% das mulheres estavam infectadas, e destas, quase 60% estavam infectadas com HPV 16, um HPV de alto risco oncogênico. Esta prevalência pode ser considerada elevada, embora esteja bem abaixo da encontrada no estudo multicêntrico realizado pelo Ministério da Saúde, que encontrou 45,6% de infecção pelo HPV em gestantes (assintomáticas) na cidade de Manaus, utilizando a técnica da captura híbrida. Estas gestantes foram incluídas neste estudo como representantes da população feminina sexualmente ativa, sem evidências de serem portadoras de DST (BRASIL, 2008), comparável, em certa medida, com a amostra deste estudo. Dentre as gestantes estudadas nas 6 capitais brasileiras, as de Manaus apresentaram a segunda maior prevalência de infecção pelo HPV, ficando atrás apenas do Rio de Janeiro (49,8%), estando portanto acima também da média nacional, que foi de 40,4% (BRASIL, 2008).

Comparando-se a prevalência de infecção por HPV em mulheres moradoras da cidade de Coari (29,1%) com as prevalências encontradas em outros estudos brasileiros cuja amostra se assemelha ainda mais à deste estudo, isto é, mulheres em exame ginecológico de rotina (quer estivessem grávidas ou não, quer apresentassem queixas clínicas ou não), encontramos alguns números mais aproximados aos nossos ou inferiores: 28,4% em Porto Alegre (IGANSI, 2005) e 21% em Florianópolis (FREDIZZI et al., 2008). Novamente no Rio de Janeiro, porém, uma prevalência maior foi encontrada: 35,3% num estudo de Moyses et al., (2008) e 56,0% num estudo de Magalhães et al., (2008). Lippman et al., (2010) encontraram 35,0% de positividade em mulheres de São Paulo/SP.

É de grande importância estabelecer os tipos de HPV circulantes em diferentes regiões, tendo em vista as diferenças relacionadas aos desfechos clínicos que os tipos de alto-risco e baixo-risco acarretam. Este conhecimento é importante também ao se tentar prever o impacto das vacinas anti-HPV até agora existentes no mercado, se seriam realmente eficazes ou não para uma determinada população.

Neste estudo, encontramos uma alta prevalência do HPV 16 entre as mulheres infectadas (58,1%). Este tipo viral é considerado de alto-risco oncogênico e tem sido, juntamente com o HPV 18, o tipo viral mais frequentemente implicado no desenvolvimento do câncer de colo de útero em todo o mundo (FINAN, TAMIM, ALMAWI, 2002; CALLEJA-MACIAS et al., 2005; STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007; TÁBORA et al., 2005). Este resultado é bastante preocupante, uma vez que mulheres infectadas com os tipos de HPV de alto risco oncogênico têm maiores taxas de progressão para neoplasia intraepitelial comparadas àquelas infectadas por vírus de baixo risco oncogênico. Outros estudos realizados no estado do Amazonas, tanto com mulheres com citologia normal quanto com mulheres apresentando anormalidades citológicas, o HPV 16 também foi o mais frequentemente encontrado (FERREIRA, 2007a; CASTRO et al., 2011).

Destacamos o fato de, na nossa amostra, não termos encontrado nenhuma mulher positiva para o HPV 18. Uma presença não muito marcante do HPV 18 pode ser uma característica peculiar encontrada nesta região do país, pois no estudo de Ferreira (2007a) através de Nested-PCR (com os pares de iniciadores MY09/MY11 e GP5+/GP6+) em mulheres com alterações citológicas (desde ASCUS até carcinoma

invasivo) realizado aqui na cidade de Manaus, esta pesquisadora encontrou apenas 4,1% das pacientes positivas para HPV 18, enquanto a positividade para o HPV 16 foi de 81,9%. No estudo de Castro et al., (2011), utilizando apenas os iniciadores MY09/MY11, não foi encontrado nenhum caso de HPV 18, sendo o HPV 16 também o predominante (56,0%). Em concordância, estudos brasileiros em outras regiões do país também têm encontrado baixa prevalência de HPV 18, tanto em mulheres sem anormalidade citológicas, quanto em mulheres com lesões precursoras e câncer (CAMARA et al., 2003; MATTOS et al., 2011).

Levamos em consideração, porém, a característica intrínseca ao método de genotipagem usado nesta pesquisa (sequenciamento gênico) de não ser capaz de detectar co-infecções, e sim o tipo viral presente em maior quantidade. A hibridização através de sondas tipo-específicas e o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) podem detectar co-infecções. Porém, o sequenciamento gênico é o único capaz de detectar todos os tipos de HPV e suas variantes presentes nas espécimes biológicas (OLIVEIRA-SILVA et al., 2011).

O HPV 58 foi significativamente encontrado nesta pesquisa (20,0%). Este tipo está estreitamente relacionado ao HPV 16, ambos pertencendo a espécie 9 do gênero alfa-papilomavírus (de VILLIERS et al., 2004; CALLEJA-MACIAS et al., 2005). Estudos mundiais trazem o HPV 58 como sétimo tipo mais frequente em mulheres com lesão precursora e câncer cervical e o sexto tipo mais frequente em mulheres sem alterações, porém diferenças nas prevalências têm mostrado marcantes diferenças regionais. As mais altas prevalências de HPV 58 encontram-se em países latino-americanos e asiáticos; já foram encontradas altas prevalências deste tipo na China, Japão, México, Costa Rica, Colômbia e Brasil (CAMARA et al., 2003; CALLEJA-MACIAS et al., 2005; CANCHE et al., 2010; TAKEHARA et al., 2011).

Os restantes 21,9% dos HPV encontrados exibiram certa variedade genotípica. Excluindo-se os tipos mais prevalentes (16 e 58), foram encontrados mais 13 tipos de HPV, tanto de baixo-risco (81, 6, 61, 70, 71 e 89), quanto de provável alto-risco (53 e 68) e alto-risco (33, 31, 35, 45, 52) (MUÑOZ et al., 2006). No estudo de Mattos et al., (2011) realizado na cidade de Vitória/ES em 284 mulheres atendidas em clínica de DST, estes autores encontraram uma variedade

genotípica ainda maior; ao todo, foram detectados 26 diferentes tipos de HPV, que foram: 6,11,13,16, 18, 26, 31, 31b, 32, 33, 34, 35, 52, 53, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 71, 81, 83 e 84, havendo predomínio também do HPV 16 (20,0%). Oliveira et al., (2010) encontraram 21 genótipos de HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 39, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 71, 81, 83 e 84), em uma amostra de 241 mulheres jovens na cidade de Niterói/RJ, com prevalência do HPV 16 (7,7%). Lippman et al., (2010) , estudando a prevalência de HPV em 386 mulheres na cidade de São Paulo, identificaram 25 tipos de HPV, com prevalência do HPV 16 (17,0%), sendo os tipos 6, 11, 16,18, 31, 33, 35, 53, 54, 58 e 61 os mais frequentes. Melgaço et al., (2011), estudando mulheres HIV-positivas na cidade do Rio de Janeiro/RJ, encontraram 20 genótipos diferentes de HPV (6, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 61, 67, 69, 71, 81) também com predominância do HPV 16 (21,6%).

Como observamos em nosso estudo, o HPV 16 mostrou-se em alta prevalência entre as mulheres infectadas (58,1%). Este dado é muito preocupante, quando comparado a outros estudos brasileiros, que apesar de também encontrarem predominância do HPV 16, o encontraram em índices bem menores (7,7% em Oliveira et al., 2010; 17% em Lippman et al., 2010; 21,6% em Melgaço et al.; 2011; 20,0% em Mattos et al., 2011), pois como evidenciado por Muñoz et al., (2006), o HPV 16 é um dos papilomavírus mais agressivos, com uma odds ratio (OR) de 281,9 para carcinoma de células escamosas e adenocarcinomas. O HPV 33, terceiro tipo viral mais encontrado neste estudo, exibe a altíssima OR de 573.4 (MUÑOZ et al., 2006), mostrando-se bastante preocupante sua presença nesta população feminina.

A alta prevalência do HPV 16 e do HPV 18 no câncer cervical e lesões precursoras levou ao desenvolvimento de vacinas contra a proteína L1 do capsídeo viral destes tipos (GIRALDO et al., 2008; LIPPMAN et al., 2010). Como citado, porém, a distribuição e a prevalência dos tipos de HPV de alto risco variam grandemente no mundo. Dados advindos de pesquisas como a nossa podem servir de base para o estudo sobre o impacto da vacina contra o HPV em mulheres brasileiras por parte das autoridades em saúde pública. Tanto nesta pesquisa como em todos os estudos brasileiros citados, o HPV, e em especial o HPV 16, foi encontrado em alta prevalência, o que levaria a crer que a vacina, seja a bivalente ou a tetravalente, poderia ter um alto impacto na redução da incidência do câncer de

colo de útero no Brasil, embora a grande variedade dos outros tipos circulantes ainda fosse motivo de preocupação.

Países desenvolvidos já têm disponibilizado a vacina no setor público. No Reino Unido, a vacina bivalente já está disponível. Os Estados Unidos, Canadá, Austrália, Israel, Dinamarca e Grécia já incluíram a vacina quadrivalente no setor público. Na Espanha, o governo dá à mulher a escolha entre uma ou outra (GIRALDO et al., 2008).

Apesar de a vacina anti-HPV ter sido liberada para uso no Brasil pela ANVISA, ela tem sido comercializada apenas pela iniciativa privada, atingindo uma pequena parcela da população, com nítida falta de acesso à vacina pela população carente. A sua introdução no programa nacional de imunização brasileiro ainda está em apreciação. Tanto o custo atual (US\$ 300,00, embora os custos possam cair substancialmente quando negociado para o setor público) quanto as dificuldades logísticas de implementar um calendário vacinal de 3 doses em um país de dimensões continentais de forma que a cobertura universal seja garantida parecem ser as maiores barreiras apresentadas (LIPPMAN et al., 2010). O cuidado em relação ao relaxamento da realização do Papanicolaou também é preocupante, uma vez que essas duas ações não deveriam se excluir, e sim se fortalecer mutuamente, principalmente porque já existem muitas mulheres infectadas no Brasil, e as vacinas oferecidas são profiláticas, não terapêuticas.

Dentre os 7 casos de mulheres com alterações citológicas, foram encontrados 5 casos (70%) de infecção pelo HPV, sendo 3 casos de HPV 16 (2 em pacientes com ASCUS e 1 em uma paciente com HSIL), 1 caso de HPV 58 em pacientes com ASCUS e 1 caso de HPV 33 em paciente com LSIL.

No nosso estudo, uma paciente com ASCUS não exibiu infecção, o que é plausível, devido a esta classificação estar mais relacionada à presença de alterações morfológicas do tipo reparativas, e não neoplásicas, sendo a maioria reversível (não houve nenhum caso de ASC-H, isto é, células escamosas atípicas não se podendo afastar lesão de alto grau). Estes dados estão de acordo (na verdade, até acima) do que traz a literatura, pois, segundo Burd (2003), aproximadamente 30 a 50% dos casos de ASCUS estão relacionados ao HPV. Para este autor, uma das vantagens da associação da detecção molecular dos HPV com

a citologia é auxiliar o diagnóstico de mulheres que apresentaram resultados indeterminados na triagem cervical comum. O estudo de Musa et al., (2010), investigando uma amostra de 126 mulheres com ASCUS, encontrou uma prevalência maior, com positividade de 43,2% para o teste de HPV de alto risco nestas mulheres.

Encontramos um caso de paciente com HSIL que não apresentou infecção por HPV. A literatura traz alguns estudos com achados semelhantes. No estudo de Ferreira (2007a) em mulheres com alterações citológicas (desde ASCUS até carcinoma invasivo) realizado aqui na cidade de Manaus, dentre 115 casos de mulheres com HSIL, esta pesquisadora encontrou 7 casos (6,0%) negativos para HPV, utilizando a técnica de PCR. Utilizando também PCR, Magalhães et al., (2008), numa amostra do Rio de Janeiro/RJ de 42 casos dentre HSIL e carcinoma, encontraram 14 (33,3%) amostras negativas para HPV.

Segundo Magalhães et al., (2008), algumas explicações possíveis a um resultado negativo de HPV por um método molecular em contraposição à citologia positiva são: baixa celularidade (quando a coleta para o estudo molecular é feita após a coleta para exame citológico) e ocorrência de falsos negativos, uma vez que o método não apresenta 100% de eficácia. No nosso caso de HSIL negativo para HPV (Amostra 24), consideramos se tratar verdadeiramente de um falso-negativo, pois esta amostra não exibiu baixa celularidade, muito pelo contrário; quando foi feita a quantificação do DNA através de aparelho NanoDrop 2000 (TERMO), esta amostra apresentou uma concentração de 2.281,0 ng/ μ L, enquanto todas as outras amostras exibiram concentração variando entre 3,5 a 254,5 ng/ μ L. Sabe-se que uma quantidade grande de DNA na reação interfere negativamente na PCR, e mesmo tendo sido feitas várias diluições, não pode ser visualizada uma banda definida no gel de agarose, apenas um rastro grosseiro. Nestes casos, seria indicada a realização de uma nova coleta ou a continuação dos testes com o DNA-molde ainda mais diluído.

O controle do câncer do colo de útero no Brasil é um assunto bastante estratégico, considerando-se a alta prevalência deste na população. Uma recente publicação oficial do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011) traz as *Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do Câncer de Colo de Útero*, dando destaque a um

conjunto de iniciativas que iriam marcar o ano de 2011 como o Ano da Priorização do Controle do Câncer de Colo de Útero. Nestas diretrizes, os autores discutem largamente o método convencional de rastreamento, o exame de Papanicolaou, e as novas tecnologias diagnósticas, sempre no âmbito da aplicabilidade clínica delas.

No Brasil e em praticamente todo o mundo, a realização periódica do exame citológico de Papanicolaou é a estratégia mais adotada para o rastreamento do câncer do colo de útero. O objetivo primordial é atingir uma alta cobertura da população definida como alvo para que se obtenha significativa redução da incidência e da mortalidade por este tipo de câncer (MOYSES et al., 2008; TERMINI, VILLA, 2008; INCA, 2011).

Porém, a ocorrência de exames citológicos falso-negativos e insatisfatórios levou o desenvolvimento de novas tecnologias visando à melhoria da qualidade e, conseqüentemente, da sensibilidade do teste. É o caso, por exemplo, da citologia de base líquida e da automação da leitura das lâminas (INCA, 2011). Estes métodos, porém, não “emplacaram” no uso comum.

Foram, porém, as evidências de que alguns tipos de HPV estão diretamente relacionados ao desenvolvimento do câncer de colo de útero que impulsionaram o desenvolvimento de métodos diagnósticos que detectassem o DNA do HPV em uma amostra ginecológica. Estes métodos, como a Captura Híbrida e a PCR, são muito mais sensíveis e já estão sendo testados como método de rastreamento de alguns países desenvolvidos como Finlândia e Holanda (TERMINI, VILLA, 2008; LEINONEN et al., 2009; INCA, 2011).

Há uma tendência, porém, a considerar-se que a melhor rotina de identificação e acompanhamento das lesões por HPV de forma a prevenir o câncer cervical é a combinação do preventivo de Papanicolaou com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR teria um importante papel complementar ao exame citológico e pode auxiliar na determinação do diagnóstico e tratamento de lesões precursoras de baixo grau que não apresentem alterações evidentes na avaliação citológica (MOYSES et al., 2008).

Em países desenvolvidos, até mesmo a detecção do HPV já tem sido considerada de valor simplório como um real biomarcador para o câncer de colo de

útero, por ter um baixo valor preditivo positivo, embora tenha um alto valor preditivo negativo. Isto porque a maioria das infecções por HPV é eliminada e apenas uma baixa porcentagem persiste induzindo lesões precursoras e câncer. Desta forma, tem sido investigado se a detecção do RNA de importantes genes virais, o E6 e o E7 de HPV de alto risco, cujas proteínas interferem em importantes proteínas do ciclo celular, como a p53 e a pRB, seria de fato a ferramenta que aumentaria a sensibilidade e especificidade destes testes na triagem de lesões com maior chance de progredirem para câncer (TERMINI, VILLA, 2008).

Nesta pesquisa, utilizaram-se os dois métodos para verificação da presença do HPV: a detecção molecular através da PCR e o exame citológico convencional. A escolha da realização do *Nested* PCR neste estudo foi devido a sua conhecida capacidade em aumentar a sensibilidade, especificidade e eficiência do processo (RODRIGUES, SILVA, SIQUEIRA, 2006). Muitos estudos para detecção do HPV utilizam esta técnica, com uso dos iniciadores degenerados MY09 e MY11, dirigidos ao gene L1 viral, para o primeiro *round* e os iniciadores GP5+ e GP6+ para o segundo (LIPPMAN et al., 2010; de LIMA et al., 2011). Estudos realizados pelo grupo de pesquisa em Diagnóstico Molecular neste programa de pós-graduação (Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia) também já têm tradição no uso desta técnica, alcançando resultados que mostram uma maior sensibilidade da *Nested* PCR (FERREIRA, 2007a; SANTOS, 2007).

Apesar de às vezes não serem encontradas diferenças entre o uso da *Nested* PCR e o uso apenas dos iniciadores GP5+ e GP6+ (de LIMA et al., 2011), o uso de *Nested* PCR é mais aconselhável quando se quer sequenciar as amostras positivas, em virtude de o sequenciamento de amostras amplificadas pelos iniciadores MY09 e MY11 serem de melhor qualidade (pois este par de iniciadores amplificam um fragmento de 450 pb) em relação ao par GP5+ e GP6+, que amplificam um fragmento de 150 pb (considerando o método de sequenciamento usado neste estudo).

Uma desvantagem da *Nested* PCR, no entanto, é a maior possibilidade de contaminação, devendo, portanto, serem seguidas todas as normas de boas práticas de um laboratório de Biologia Molecular (ROSSETTI, 2006). Em nosso estudo, as amostras provenientes do primeiro *round* de reação foram armazenadas no freezer

específico de material amplificado (“área suja”), e o gel foi aplicado nesta mesma área. Nenhum material amplificado foi levado à sala de PCR. Além disso, em todas as reações do segundo *round* eram utilizados dois controles negativos, o “branco 1” (amostra com água da primeira reação) e o “branco 2” (amostra com água da segunda reação). Se algum dos brancos apresentasse amplificação ou rastro de DNA, a reação era repetida.

Segundo de Lima et al., (2011), a sensibilidade e a especificidade dos testes de HPV dependem também do tipo e da qualidade da amostra biológica e da qualidade dos reagentes empregados, incluindo os diferentes tipos de DNA polimerases. Neste estudo, buscamos utilizar uma enzima de alta qualidade, a *Platinum® Taq DNA Polymerase* (INVITROGEN). Esta enzima possui a tecnologia do anticorpo ligado a ela, que bloqueia sua ação à temperatura ambiente, ocorrendo a separação entre a enzima e o anticorpo apenas durante a fase de desnaturação inicial, a 94°C (tecnologia *Hot Start*). Dessa forma, evita-se a síntese de DNA a partir de anelamentos inespecíficos (RODRIGUES, SILVA, SIQUEIRA, 2006).

Dentre as pacientes com laudo citológico normal, encontramos a prevalência de 31,8% de infecção pelo HPV, o que pode ser considerado bastante elevado. Steben & Duarte Franco (2007) afirmam que estudos mundiais indicam cerca de 13,4% de infecção por HPV em mulheres com citologia normal e Moyses et al., (2008) afirmam que é comum que entre 10 a 15% de mulheres com citologia normal apresentem DNA de HPV, o que é bem abaixo do que encontramos. Estes últimos autores encontraram 14,4% de infecção por HPV em mulheres sem alterações citológicas na cidade do Rio de Janeiro/RJ. Magalhães et al., (2008) também em um estudo no Rio de Janeiro/RJ, encontraram 39,3% de positividade para HPV em mulheres com citologia normal. Em nosso estudo, esta alta prevalência de mulheres positivas para o HPV, porém sem alterações citológicas, é significativa, pois embora a infecção pelo HPV possa ser transitória, a persistência da infecção pode colocar todas estas mulheres em um grupo de risco para desenvolvimento do câncer cervical, devendo, portanto ser acompanhadas de forma mais cuidadosa (TERMINI, VILLA, 2008), principalmente aquelas que apresentaram infecção por HPV de alto risco oncogênico.

A prevalência da infecção por HPV parece ser maior em mulheres jovens, com um pico da infecção em mulheres com idade inferior a 25 anos (STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007). Segundo Fredizzi et al., (2008) uma explicação possível seria o desenvolvimento de resposta imune adaptativa pelos indivíduos infectados que poderia prevenir a aquisição de infecções futuras. Na dependência da resposta imunológica pessoal, as lesões progrediriam ou não (PASSOS et al., 2008). Fredizzi et al., (2008) também relatam, porém, estudos que evidenciam um segundo pico de idade após os 55 anos. Quando comparamos as médias das idades das mulheres com e sem infecção pelo HPV em nosso estudo, encontramos médias muito próximas ($36,0 \pm 13,2$ e $36,6 \pm 13,5$ anos, respectivamente), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,668$). Quando analisamos as faixas etárias, curiosamente encontramos a maior prevalência na faixa etária entre 55 e 64 anos (34,6%), seguida da faixa etária de 25 a 34 anos (31,3%).

Alguns fatores sócio-demográficos são descritos como fatores de risco para a infecção por HPV, como por exemplo, baixo grau de escolaridade. Neste estudo observamos, porém, em termos proporcionais, uma prevalência um pouco maior de mulheres com ensino fundamental completo em relação às aquelas com ensino fundamental incompleto, mas a diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,322$).

Os fatores de risco para infecção pelo HPV relacionados ao comportamento sexual mais comumente citados são: grande número de parceiros sexuais ao longo da vida, sexo desprotegido (embora o vírus também provoque lesões na genitália externa não protegida pelo preservativo) e idade precoce da primeira relação sexual, possivelmente pelo aumento do tempo de exposição ao vírus (STEBEN, DUARTE-FRANCO, 2007). Neste estudo, porém, a menor prevalência foi encontrada em mulheres com número maior de parceiros sexuais (acima de 10) do que mulheres que tiveram de 1 a 5 parceiros e 6 a 10 parceiros, sem contudo apresentar uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,199$). Em relação à idade da primeira relação sexual, as médias de idade foram muito próximas, sendo $15,7 (\pm 2,4)$ anos para as mulheres HPV-positivas e $15,9 (\pm 2,5)$ para as mulheres HPV-negativas ($p=0,32$).

Outros fatores de risco relacionados ao comportamento sexual foram analisados (estado civil, uso de preservativos com parceiros fixos e eventuais, história prévia de DST e relacionamento com parceiro com história prévia de DST), sem, contudo mostrarem diferenças significativas de prevalência, e quando mostraram, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos infectado e não infectado.

2

6.4 – Infecção pelo Herpes Vírus Simples 2

A associação entre o herpes simples 2 (HSV-2), uma DST formadora de úlcera, e a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) tem aumentado o interesse sobre a epidemiologia do HSV-2. Considera-se que mais de 70% das infecções por HSV-2 não sejam conhecidas, portanto, estudos epidemiológicos são importantes para o entendimento do padrão de distribuição da infecção dentro das populações (COWAN et al., 2003; CLEMENS, FARHAT, 2010).

A comparação direta dos estudos epidemiológicos relativos ao HSV-2 deve, no entanto, ser considerada com cautela, principalmente devido à metodologia laboratorial e às diferenças nas populações estudadas. Mesmo comparando estudos sorológicos, é preciso atentar que o HSV-1 e HSV-2 são antigenicamente relacionados e, portanto, o teste diagnóstico usado, se específico ou não, é crítico para comparação de prevalências (CLEMENS, FARHAT, 2010). Como se pode observar dos estudos brasileiros citados no quadro 4 da revisão de literatura, o método diagnóstico usado nos estudos mais antigos usavam a combinação do ELISA (para detectar anticorpo anti-HSV) e *Western blot* (para discriminar entre HSV-1 e HSV-2) (WEINBERG et al., 1993; CARVALHO et al., 1999; PASCHOINI et al., 2001) enquanto que só mais recentemente os testes de ELISA discriminaram entre anticorpos anti-HSV-1 e anti-HSV-2 (COWAN et al., 2003; SANTOS et al., 2006; CLEMENS, FARHAT, 2010). Nos estudos acima relatados, as soroprevalências para o HSV-2 tanto por ELISA, quanto pela combinação de ELISA com *Western blot* em mulheres brasileiras (gestantes, HIV-positivas, estudantes universitárias, etc) variaram entre 7,3% e 50,7%.

Considerando a importante característica comum a todos os herpes vírus conhecidos de apresentarem um longo ciclo infeccioso latente após uma fase de replicação ativa, e que, durante esse período latente a maioria dos genes virais é silenciada e partículas virais não são formadas (SUBAK-SHARPE, DARGAN, 1998; MAITRA, GUPTA, 2007; PAULUS, NITZSCHE, NEVELS, 2010); e considerando também que o HSV-2, responsável por 90% das lesões genitais, apresenta latência no gânglio sacral (neurolatência) e que não está presente nos tecidos epiteliais e conjuntivos a não ser nas fases de reativações (PASCHOINI et al., 2001; CONTI, MALACRINO, MASTROMARINO, 2009), é completamente plausível que o tipo de amostra utilizada nesse estudo não seja adequada para um estudo de prevalência.

Outras utilidades existem para a detecção do vírus em amostra cervical, como por exemplo, avaliar se uma parturiente previamente diagnosticada como portadora da infecção está em fase de reativação assintomática. Nesse caso, seria indicado um parto cesariano para evitar a ocorrência de herpes neonatal decorrente de contaminação no canal do parto (WEINBERG et al., 1993; PASCHOINI et al., 2001; CLEARY et al., 2005; DINC et al., 2010).

Para este caso (detecção de HSV-2 em amostra cervical), e também para diagnóstico da presença do vírus em úlceras genitais, vários protocolos para detecção molecular do HSV-2 têm sido desenvolvidos e substituído a cultura viral, com aumento da sensibilidade (COREY et al., 2005; SUNTOKE et al., 2009; DINC et al., 2010).

Neste estudo utilizamos um protocolo de PCR em tempo real do tipo *TaqMan* desenvolvido por Corey et al., (2005), cujos iniciadores amplificam tanto o HSV-1 quanto o HSV-2, e a especificidade entre um e outro é dada por duas diferentes sondas marcadas com diferentes fluoróforos, possibilitando um ensaio do tipo *multiplex*. Este estudo de Corey et al., (2005) mostrou boa sensibilidade e especificidade, além de 100% de concordância na tipagem viral em relação ao *status* sorológico determinado por ELISA e *Western blot*.

A PCR em tempo real apresenta algumas vantagens em relação à PCR convencional, inclusive na área de diagnóstico de patógenos. Dentre estas vantagens, além de permitir fazer um ensaio simples de presença/ausência, permite também a quantificação do DNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade.

Além disso, este ensaio distingue o momento do ciclo da reação na qual a amplificação de um alvo é detectada pela primeira vez (*Cycle Threshold – CT*), ao invés de apenas a quantidade de alvo acumulado após um número fixo de ciclos. Apresenta também como vantagens maior sensibilidade, precisão e reprodutibilidade e ainda maior velocidade e facilidade da análise dos resultados, uma vez que neste ensaio o resultado é lido por programa de computador acoplado à máquina de PCR em tempo real, não sendo necessário nenhum processamento pós-reação (corrida em gel de agarose ou poliacrilamida para visualização do fragmento amplificado). Apresenta, contudo a desvantagem de um custo mais elevado (NOVAIS, ALVES, 2004).

Em nosso estudo, foram encontradas duas mulheres positivas para o HSV-2 em amostra cervical (Amostras 6 e 7). Muito provavelmente, tratam-se de mulheres com infecções desconhecidas (pois nenhuma delas relatou história prévia de DST), que estavam em fase de reativação assintomática (pois não relataram queixas clínicas relacionadas à presença de úlceras). Essas deduções deveriam ser confirmadas com a análise conjunta da sorologia para HSV-2. Outros estudos como os de Corey et al., (2005) e Dinc et al., (2010), comparando a sorologia com a detecção do HSV-2 por técnica molecular em amostras cervicais e/ou úlceras são necessários para que se possa ter mais segurança em relação à aplicabilidade deste ensaio.

As duas mulheres infectadas apresentavam citologia normal, porém ambas estavam co-infectadas pelo HPV-16. O HSV-2 é citado, juntamente com a bactéria *C. trachomatis*, como os patógenos sexualmente transmissíveis mais frequentemente relacionados com o desenvolvimento de câncer de colo de útero agindo em co-infecção com o HPV. O risco oncogênico aumentado por estes patógenos está relacionado, pelo menos em parte, com a resposta inflamatória que está associada com a geração de radicais livres e instabilidade genética (MUÑOZ et al., 2006).

As mulheres infectadas relataram estar casadas ou em união estável com um companheiro, não estarem grávidas atualmente, não terem sofrido ou provocado aborto, não terem tido nenhum parceiro sexual eventual e apenas 1 parceiro fixo nos últimos 12 meses, com o qual relataram nunca usar preservativo. Relataram também

desconhecer qualquer infecção prévia por DST nelas mesmas e em seus parceiros. Essas mulheres apresentaram baixo nível de escolaridade (fundamental incompleto) e uma delas estava em franca idade reprodutiva (33 anos) enquanto a outra tinha 47 anos.

Devido a essa baixa frequência absoluta ($n=2$, correspondente a 0,6%), não foram feitas análises estatísticas de associação da infecção por este patógeno e as variáveis citadas. O estudo de Dinc et al., (2010) realizado na Turquia que também usou amostra cervical para diagnóstico do HSV-2 em mulheres grávidas e não-grávidas encontrou também baixa prevalência (2,2% e 2,0%, respectivamente), o que é muito abaixo do que trazem os estudos de soroprevalência, demonstrando a inadequabilidade da amostra e do método para estudos epidemiológicos devido às características peculiares da biologia viral.

6.5 – Infecção pelo Citomegalovírus Humano

O HCMV é transmitido pelo contato direto com fluidos corporais de pessoas excretando o vírus. Uma diferença marcante em relação ao HSV-2 é que, após a aquisição inicial, o HCMV é excretado em altos títulos na urina, saliva, lágrima, sêmen e secreções cervicais por meses ou anos, enquanto que o HSV-2 é excretado apenas localmente e em um curto intervalo de tempo, tanto durante a infecção inicial quanto nas reativações (HO, 2008; RÁCZ, 2008).

Essa característica da biologia viral faz do tipo de amostra analisada nesta pesquisa, amostra cervical colhida com *citobrush*, portanto contendo tanto fluido quanto células cervicais, uma amostra mais adequada para detecção do HCMV em relação à detecção do HSV-2. A urina também é uma opção para detecção do vírus através de PCR, mas principalmente em bebês de até 12 semanas (que excretam o vírus em altos títulos na urina e cuja urina tem pouca uréia, um elemento inibidor de PCR) para avaliar a infecção congênita (até 3 semanas) e perinatal (entre 4 e 12 semanas) (YAMAMOTO et al., 1998). Sendo a infecção pelo HCMV uma infecção disseminada, a pesquisa através de testes moleculares usando como amostra o sangue pode detectar a doença na fase ativa e na fase de latência. No entanto, para estudos de prevalência, a sorologia permanece como metodologia mais usada,

sendo capaz de detectar todos os portadores da infecção viral (INAGAKI et al., 2009; SOUZA et al., 2010; MATOS, MEYER, LIMA, 2010).

No nosso estudo, o HCMV foi o terceiro patógeno sexualmente transmissível mais encontrado. Foram encontradas 30 mulheres (8,3%) positivas para a presença do HCMV na secreção cervical. Certamente não cabe a comparação dos dados encontrados neste estudo com os dados advindos de estudos de soroprevalência, pois na amostra cervical, somente podem ser detectadas partículas virais em mulheres com infecção primária ou em fase de reativação.

A maior quantidade de mulheres positivas para HCMV em relação ao HSV-2 em nosso estudo pode ser um dado verdadeiro, ou pode ser devido ao fato do HCMV ser excretado em vários tipos de secreções corporais por muito mais tempo (meses ou anos) (HO, 2008) em comparação com o HSV-2 (PAULUS, NITZSCHE, NEVELS, 2010). Para confirmação, seria necessária a comparação com o *status* sorológico das pacientes em relação aos dois vírus.

Não desconsiderando a importância do diagnóstico sorológico na infecção pelo HCMV, a detecção deste vírus em fluidos corporais teria uma indicação muito importante na área ginecológica/obstétrica relacionado ao diagnóstico de infecção congênita ou perinatal em urina de bebês, proporcionando a intervenção com recursos terapêuticos que podem minimizar a gravidade dos casos e, no caso das infecções congênitas, possibilitando diminuir a intensidade das sequelas (YAMAMOTO et al., 1998). A detecção na secreção cervical diagnosticaria a mulher excretando ativamente o vírus, porém não discriminaria entre infecção primária e reativação, o que poderia ser feito em um acompanhamento de soroconversão durante a gestação (NIGRO et al., 2003).

O diagnóstico do HCMV em fluidos e secreções corporais através da detecção do DNA viral por PCR e PCR em tempo real já tem sido feito por alguns autores, com sensibilidade comparável ao isolamento viral (YAMAMOTO et al., 1998; TERRA et al., 2000; NIGRO et al., 2003; BIRI et al., 2006; SPANO et al., 2007; DINC et al., 2010). No nosso estudo, utilizamos o ensaio de PCR em tempo real do tipo presença/ausência da *Applied Biosystems*. Apesar do custo mais elevado dessa metodologia, a maior facilidade na execução dos procedimentos laboratoriais, a desnecessidade de qualquer procedimento pós-reação e a ausência de subjetividade

na análise do resultado apresentaram-se como enormes vantagens em relação à PCR convencional.

No nosso estudo, encontramos mulheres mais jovens infectadas pelo HCMV. A média das idades das mulheres infectadas foi bem abaixo da média das mulheres não infectadas ($32,3 \pm 14,0$ e $36,8 \pm 13,3$ anos, respectivamente), porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,078$). O grupo de mulheres solteiras/divorciadas/viúvas apresentou uma maior prevalência (9,8%) em relação às casadas/união estável (7,9%), e o grupo de mulheres que relatou ter tido mais de 10 parceiros sexuais ao longo da vida apresentou também maior prevalência (10,7%) em relação aos grupos que relataram 1 a 5 parceiros (8,5%) e entre 6 e 10 (6,1%). Foi encontrada maior prevalência entre as mulheres que afirmaram uso não frequente do preservativo com parceiros fixos (12,9%) em relação às que não usavam (8,3%), mas em relação aos parceiros eventuais, foi maior a prevalência entre mulheres que relataram uso frequente do preservativo (14,3%) em relação às que disseram usar “sempre” (8,0%). Entretanto, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas quatro situações citadas.

Neste estudo, duas mulheres disseram-se conhecedoras da sua condição de soropositividade para o HIV. Destas mulheres, uma apresentou infecção pelo HCMV. Esta paciente certamente era desconhecedora desta situação, uma vez que relatou não ter história prévia de DST em seu passado clínico, e afirmou também não ter se relacionado nos últimos 12 meses com parceiro portador de uma DST. A infecção pelo HCMV é muito preocupante em pessoas com quadros de imunodeficiência, pois este é um vírus oportunista, que causa severos quadros de pneumonite, lesões gastrointestinais, hepatite, retinite, pancreatite, miocardite e às vezes encefalite, além de maior propensão à outras infecções oportunistas fúngicas e bacterianas (BAYRAM, ÖZKUR, ERKILIC, 2009; BOECK, GEBALLE, 2011). Nestes pacientes, somente a detecção através de PCR não necessariamente correlaciona-se com doença ativa, porque os vírus que se encontram em estado latente também podem ser amplificados. A PCR em tempo real, portanto, também tem sido utilizada para detecção e quantificação de carga viral. Um ensaio quantitativo de infecção pelo HCMV é uma ferramenta importante, pois a análise da carga viral no sangue é um importante fator preditivo de infecção e aparecimento de doenças em pacientes HIV-positivos (TERRA et al., 2000; CUNHA et al., 2002).

As infecções assintomáticas são predominantes na população, e em nossa amostra não foi diferente. Todas as 30 mulheres infectadas pelo HCMV desconheciam a sua infecção, pois nenhuma delas relatou história prévia de DST. Duas mulheres relataram ter se relacionado sexualmente nos últimos 12 meses com parceiros portadores de DST, que foram HPV e gonorréia.

Em nossa amostra, das 30 mulheres infectadas, 20 delas (66,6%) referiram procurar o serviço de saúde para exame de rotina, isto é, estavam completamente assintomáticas. As 10 restantes (33,3%) relataram queixas clínicas, que foram: corrimento vaginal, dificuldade de urinar, prurido e dor pélvica. No entanto, queixas clínicas verdadeiramente relacionadas à infecção por citomegalovírus (ex: febre, astenia, síndrome gripal) não foram avaliadas, pois as opções dadas no questionário referiam-se às queixas ginecológicas.

Das 5 mulheres que estavam gestantes em nosso estudo, uma delas apresentou-se positiva à infecção pelo HCMV. Nas mulheres grávidas, a infecção por este vírus é frequentemente uma séria ameaça ao feto. Perda auditiva e severo dano neurológico são as principais manifestações da infecção congênita, e menos frequentemente ocorre morte fetal ou neonatal. Esta mulher pode estar em infecção primária ou em reativação da infecção e tanto uma como outra situação são quase sempre assintomáticas e favorecem a disseminação viral horizontal e vertical (GERNA, BALDANTI, REVELLO, 2004; HO, 2008). Uma vez que esta paciente está excretando o vírus ativamente, transmissão congênita ou perinatal pode ocorrer.

A despeito da alta prevalência mundial, as infecções pelo HCMV são geralmente invisíveis na população, exceto em recém-nascidos de mães infectadas e em pacientes imunodeprimidos, como citado, nos quais o HCMV afeta muitos órgãos (BOECK, GEBALLE, 2011). Eliminar ou reduzir a morbidade associada com a infecção pelo HCMV durante a gravidez seria o foco do rastreamento sorológico durante essa fase.

6.6 – Infecção pela *Chlamydia trachomatis*

As infecções clamidiais são largamente difundidas na população em geral, afetando principalmente população jovem entre 16 e 24 anos de idade. Os fatores

de risco incluem uma alta frequência de mudança de parceiro sexual, múltiplos parceiros, início precoce de atividade sexual, passado de DST e sexo desprotegido (TÁBORA et al., 2005; CODES et al., 2006; BÉBÉAR, BARBEYRAC, 2009; SHAW et al., 2011).

Em nosso estudo encontramos prevalência de 6,4% de infecção pela *C. trachomatis* na amostra estudada de mulheres da cidade de Coari/AM. Comparando-se esta prevalência com outros estudos brasileiros realizados em amostras semelhantes a nossa, isto é, mulheres em exame ginecológico de rotina, observamos uma prevalência menor em nosso estudo em relação aos outros. Igansi (2005) encontrou 12,6% de positividade em mulheres de Porto Alegre/RS, Barcelos et al., (2008) encontraram 7,4% de positividade em mulheres na cidade de Vitória/ES e Piazzetta et al., (2011) observaram positividade de 10,7% em Curitiba/PR, todos os estudos utilizando também PCR.

Em estudos realizados com amostras de mulheres em grupos diferenciados, como mulheres inférteis, mulheres atendidas em clínicas de DST, gestantes e adolescentes, a prevalência parece ser maior. Em adolescentes assintomáticas, Guimarães et al., (2009) encontraram a prevalência de 14,5% na cidade de Goiânia/GO. Dada a relação causal deste patógeno com a infertilidade, mulheres atendidas em clínica de infertilidade ou de planejamento familiar apresentaram 11,4% de infecção em Salvador/BA (Codes et al., 2006), 10,0% em Recife/PE (Marques et al., 2007) e 13,5% em Campinas/SP (Fernandes et al., 2009). Todos estes estudos foram realizados através de detecção molecular (PCR). No estudo multicêntrico realizado pelo Ministério da Saúde em seis capitais brasileiras utilizando a captura híbrida para detecção, foi verificada prevalência de 9,4% em mulheres gestantes e 7,3% em mulheres atendidas em clínicas de DST (BRASIL, 2008).

O nosso estudo apresentou baixa prevalência também em relação a estudos realizados no estado do Amazonas, especificamente na cidade de Manaus. Porém, as amostras desses estudos eram de grupos diferenciados (mulheres atendidas em serviços de DST ou de infertilidade e gestantes). Em estudos conduzidos na Fundação Alfredo da Mata, hospital referência no tratamento de DST em Manaus, Santos et al., (2003) encontraram 20,7% de mulheres infectadas por clamídia,

utilizando PCR como método de detecção. Benzaken et al., (2008) encontraram 10,0% de prevalência e Benzaken et al., (2010) encontraram 13,0% utilizando exame de captura híbrida em mulheres neste hospital. O estudo multicêntrico do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008) revelou 7,8% de infecção em mulheres atendidas no mesmo hospital e 11,6% em gestantes. Em Manaus, o estudo de Freitas (2011) detectou por PCR a altíssima prevalência de 52,8% em mulheres inférteis atendidas no Hospital D. Francisca Mendes, na zona leste de Manaus, corroborando com a literatura no que diz respeito à relação entre infecção por *C. trachomatis* e infertilidade secundária.

Nos estudos epidemiológicos, os dois métodos mais usados para detecção da *C. trachomatis* são a captura híbrida e a PCR. O teste de captura híbrida disponível comercialmente é o da DIGENE (Hybrid Capture II (HC2), Digene Corporation (QUIAGEN)), cujos alvos de anelamento na *C. trachomatis* incluem tanto uma porção plasmidial quanto uma cromossômica. Estes kits ainda têm a opção de sondas conjuntas para detecção da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae* (HARKINS, MUNSON, 2011). O teste de captura híbrida é aprovado para uso no Brasil pela ANVISA.

Os métodos de amplificação de ácidos nucleicos utilizam iniciadores que podem anelar no plasmídeo bacteriano, no DNA cromossomal (geralmente o gene *omp1*, que codifica a proteína maior de membrana) e no gene 16S ribossomal. A detecção de um gene que esteja presente no DNA plasmidial parece conferir vantagem em relação ao DNA cromossomal, pois apresenta-se de 7 a 10 cópias na bactéria, conforme o número de cópias do plasmídeo (LAN, 1993; MAHONY et al., 1993; SEADI, 2006). Entretanto, estudos sugerem que variantes livres de plasmídeo podem, mesmo que em raras ocasiões, estar presentes em amostras clínicas, e a infecção não seria detectada nestas pacientes (FREDLUND et al., 2004; MAGBANUA et al., 2007).

Existem alguns testes comerciais de PCR para detecção da *C. trachomatis* disponíveis no mercado. Um dos mais conhecidos é o teste dos laboratórios Roche (*Roche Diagnosis*) e Abbott (*Abbott Laboratories*) (HARKINS, MUNSON, 2011). As sondas destes testes hibridizam no DNA plasmidial, de forma que além das variantes de clamídia livres de plasmídeo, a descoberta de uma variante que exhibe

uma deleção de 377 pb nessa região (“variante sueca”) leva a resultados falso-negativos (MAGBANUA et al., 2007; UNEMO et al., 2010). Estes laboratórios já lançaram ensaios cujos iniciadores hibridizam não só em uma outra porção do plasmídeo não afetada pela deleção quanto em uma porção do DNA cromossômico da bactéria (*Abbott Real-Time CT/NG e Roche Cobas TaqMan CT 2.0*) (UNEMO et al., 2010).

Iniciadores muito usados nos estudos de detecção de clamídia são os pares CPT1-CPT2 e KL1-KL2, ambos anelando em sequências de DNA plasmidial (LAN et al., 1993; MAHONY et al., 1993). Neste estudo, decidiu-se usar os iniciadores KL1 e KL2, pois apesar da possibilidade de algum falso-negativo devido à presença de *C. trachomatis* livre de plasmídeo ou a uma variante sueca, estes parecem ser eventos bastante raros em amostras clínicas (FREDLUND et al., 2004; UNEMO et al., 2010). Este par de iniciadores apresentam alta sensibilidade, e amplificam um fragmento de 241 pb bem visível em gel de agarose, sem a presença de bandas inespecíficas (MAHONY et al., 1993).

A escolha da enzima em nosso trabalho também deve ser considerada. Com o objetivo de obter resultados ótimos em relação ao desempenho da PCR, optamos por usar a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (INVITROGEN) baseados no estudo prévio de Freitas (2011). Neste estudo, a autora observou um marcante aumento de sensibilidade na detecção da *C. trachomatis* (52,8%) por esta enzima em relação à outra comercial (5,7%). Esta enzima possui uma alta fidelidade na incorporação dos nucleotídeos devido a sua atividade exonuclease 3'→5' e possui também a tecnologia do bloqueio com o anticorpo à temperatura ambiente (tecnologia *Hot Start*), aumentando a especificidade da reação.

Apesar de a literatura relatar ser a infecção por clamídia mais prevalente em mulheres jovens, no nosso estudo encontramos uma maior prevalência em mulheres acima de 64 anos (12,5%), seguida por mulheres na faixa etária entre 55 a 64 anos (11,5%). As faixas etárias inferiores variaram entre 4,0 e 7,0%. Atribuímos essa diferença em relação a outros estudos à ampla faixa etária das mulheres participantes dessa pesquisa (18 a 78 anos), destacando que não participaram adolescentes menores de idade, um grupo considerado de alta prevalência para clamídia (GUIMARÃES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008a). Comparando-se as

médias de idade entre os grupos infectado e não infectado ($38,7\pm 15,8$ e $36,3\pm 13,2$, respectivamente) observamos uma média maior no grupo infectado, porém sem significância estatística ($p=0,394$).

Analisando a variável grau de escolaridade, observamos que a prevalência da infecção pela *C. trachomatis* foi maior em mulheres com menor nível de escolaridade: no grupo com ensino fundamental incompleto a prevalência foi de 8,2% e no grupo com ensino fundamental completo a prevalência foi de 5,0%. Esta diferença, contudo, não foi estatisticamente significativa ($p=0,213$).

Em relação às variáveis de comportamento sexual, apesar de não haver tido diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, observamos certa concordância com o perfil de comportamento sexual de mulheres infectadas por clamídia de acordo com o que relata a literatura: houve maior prevalência em mulheres que tiveram mais de 10 parceiros sexuais ao longo da vida (10,7%) e naquelas que relataram o não uso frequente de preservativo tanto com parceiros fixos (6,8%) quanto com eventuais (14,3%). A idade da primeira relação sexual, porém, foi ligeiramente maior em mulheres infectadas ($16,2\pm 2,9$) do que em mulheres não-infectadas ($15,8\pm 2,5$) ($p=0,496$). Das 23 mulheres infectadas, nenhuma relatou ter tido DST no passado e apenas 1 (5,3%) informou já ter se relacionado com parceiro portador de DST previamente.

Das 23 mulheres infectadas, a maior parte delas (54,5%) estava completamente assintomática contra 45,5% que vieram apresentando queixas clínicas. As queixas relatadas foram: dor pélvica, corrimento vaginal e prurido, à semelhança do que relata a literatura (BÉBÉAR, BARBEYRAC, 2009; SHAW et al., 2011).

Sabe-se que a infecção por clamídia pode muitas vezes cursar de maneira assintomática em mulheres, e estas permanecem na condição de reservatórios silenciosos do patógeno (“epidemia silenciosa”) (LOGAN et al., 2005; BERGEN et al., 2006). Neste estudo pretendeu-se identificar essa característica em mulheres por ocasião do exame ginecológico de rotina (rastreamento oportunístico).

O rastreamento de mulheres assintomáticas com o objetivo de controlar a transmissão das DST e prevenir as sequelas futuras de uma infecção desconhecida

até então para o paciente tem sido motivo de discussão. Países desenvolvidos, como Estados Unidos, Inglaterra, Suécia e Holanda têm mantido rastreamento anual para clamídia em mulheres com até 24 anos, com estudos de custo-efetividade positivos quando se usam testes de amplificação de ácidos nucléicos e autocoleta, seja com *swab* vaginal autocoletável ou exame de urina (HONEY et al., 2002; BERGEN et al., 2006; CHENG, QIAN, KIRBY, 2011; LUPPI et al., 2011; SHAW et al., 2011). No Brasil, o único rastreamento para DST de forma sistemática tem sido a detecção de sífilis e HIV realizado durante o pré-natal e/ou parto (FERNANDES et al., 2009; BRASIL, 2010).

Em nosso estudo, encontramos 6,4% de prevalência geral para clamídia, tendo sido uma das prevalências mais baixas encontradas em estudos brasileiros. Na faixa etária de 18 a 24 anos, encontramos 5,7% de infecção. Em países desenvolvidos, esse número já seria considerado suficiente para organização de um programa de rastreamento. Por exemplo, O'Connell et al., (2009) encontraram prevalência de 4,8% em mulheres jovens estudantes universitárias na Irlanda, e já sugerem, alarmados, a implantação de um programa dessa natureza. Honey et al., (2002) afirmam que o rastreamento é custo-efetivo em prevalências em torno de 3,1 a 10,0%, com estimativa de prevenção de doença inflamatória pélvica em 1 a cada 83 mulheres rastreadas.

Para Luppi et al., (2011), para países em desenvolvimento como o Brasil, o número reduzido de pontos de atendimento com a tecnologia apropriada para realização de testes moleculares e com custo aceitável para diagnóstico de forma imediata dificultam a aplicação de rastreamento para clamídia. Numa recente publicação oficial do Ministério da Saúde sobre o tema Rastreamento (BRASIL, 2010), o tema é considerado com reservas, pois "... Dada à conjuntura, o Brasil, com situações de pobreza e má distribuição de riquezas, pode dar-se ao "luxo" de pensar em prevenção de doenças que exijam altas tecnologias?", assumindo o pensamento de que a "preocupação com a saúde futura ainda parece ser um item de luxo".

6.7 – Infecção pela *Neisseria gonorrhoeae*

A prevalência de infecção pela *N. gonorrhoeae* em nosso estudo foi de 1,4%, assemelhando-se em muito aos estudos brasileiros realizados em amostras de mulheres assintomáticas, examinadas durante consulta ginecológica de rotina, que mostraram prevalências de 1,5%, 1,9% e 2,0% nas cidades de Curitiba/PR, São Paulo/SP e Vitória/ES, respectivamente, utilizando cultura celular ou PCR para diagnóstico (BARCELOS et al., 2008; LUPPI et al., 2010; PIAZZETTA et al., 2011).

Resultado muito próximo também do estudo multicêntrico do Ministério da Saúde (BRASIL, 2008) realizado com gestantes, que encontrou prevalência de 1,5% de infecção nessas mulheres em seis capitais brasileiras. Especificamente na cidade de Manaus, este mesmo estudo relatou a prevalência de 1,0% desta bactéria em gestantes assintomáticas, através de detecção por captura híbrida.

Quando analisamos estudos realizados em mulheres atendidas em ambulatórios de DST, os números são significativamente maiores, pois, apesar de alguns casos poderem ser assintomáticos, a infecção pelo gonococo produz quase sempre sintomas bastante incômodos, como prurido e corrimento vaginal, levando o portador a procurar o serviço de saúde (NG, MARTIN, 2005; SCHIELKE, FROSCH, KURZAI, 2010). No estudo multicêntrico do Ministério da Saúde foi observada prevalência de 3,3% em mulheres atendidas em clínicas de DST de hospitais de referência em seis capitais brasileiras, usando captura híbrida como método de detecção. Na cidade de Manaus este número foi de 6,1% em mulheres atendidas na Fundação Alfredo da Mata, estando bem acima da média nacional (3,3%), ficando atrás apenas da cidade de Porto Alegre (7,3%) (BRASIL, 2008). Neste mesmo hospital na cidade de Manaus, destacam-se os estudos de Benzaken et al., (2006) e Benzaken et al., (2010) que relatam a alta prevalência de 15,0% e 7,1%, desta vez usando cultura celular para detecção da bactéria.

Em geral, os testes moleculares têm uma sensibilidade maior que a cultura celular. Como vantagens, apresentam também a facilidade de não requererem microorganismos viáveis, permitirem condições de transporte menos estridentes e possibilidade de usar urina e amostras de *swabs* vaginais auto-coletadas. As vantagens incluem maior custo, possibilidade de contaminação ou de inibição da reação, mas principalmente a incapacidade em prover informações a respeito da

resistência antibiótica, o que é muito importante no atual contexto (WHILEY, TAPSALL, SLOOTS, 2006).

À semelhança do que acontece com a *C. trachomatis*, os estudos epidemiológicos mais recentes utilizam como método de detecção da *N. gonorrhoeae* a captura híbrida e a PCR. O teste de captura híbrida disponível comercialmente é o da DIGENE (Hybrid Capture II (HC2), Digene Corporation (QUIAGEN), cujos alvos de anelamento na *N. gonorrhoeae* incluem tanto uma porção plasmidial quanto uma cromossômica. Como citado anteriormente, estes kits ainda têm a opção de sondas conjuntas para detecção da *C. trachomatis* e da *N. gonorrhoeae* (FREDLUND et al., 2004; HARKINS, MUNSON, 2011).

Os testes de amplificação de ácidos nucleicos para detecção da *N. gonorrhoeae* estão disponíveis desde o início dos anos 1990. No decorrer desses anos, vários ensaios de PCR foram desenvolvidos, com iniciadores que podem anelar em genes cromossômicos, plasmidiais, ou ainda no gene 16S do RNA ribossomal (FREDLUND et al., 2004).

Nestes vários ensaios desenhados, problemas de falso-positivos e falso-negativos sempre foram relatados. Os resultados falso-positivos estão frequentemente relacionados às trocas genéticas que ocorrem dentro do gênero *Neisseria*, levando espécies saprófitas a adquirirem genes da *N. gonorrhoeae*. Por exemplo, ensaios de PCR utilizando gene 16S de RNA ribossomal como alvo não têm discriminado entre as espécies saprófitas e a *N. gonorrhoeae*. Os falso-negativos estão geralmente relacionados a alguns subtipos de *N. gonorrhoeae* em que faltam genes usados como alvo em muitos ensaios de PCR. Um exemplo é o gene plasmidial *cppB*, que por algum tempo foi usado como alvo para detecção da *N. gonorrhoeae*, mas tem sido mostrado que este gene está ausente em muitos subtipos bacterianos (WHILEY et al., 2004; HJELMEVOLL et al., 2006; WHILEY, TAPSALL, SLOOTS, 2006).

Um dos testes mais conhecidos de PCR comercial disponível no mercado é o *Roche Cobas Amplicor CT/NG Assay (Roche Diagnostics)*. A maioria dos testes comerciais são *PCR-multiplex* para gonococo e clamídia. Já foi observado, porém, que as sondas para *N. gonorrhoeae* destes testes anelam também em espécies saprófitas de *Neisseria*, promovendo resultados falso-positivos de *N. gonorrhoeae*.

Os resultados positivos precisam então ser confirmados através de outro método (HJELMEVOLL et al., 2006; CHENG, QIAN, KIRBY, 2011).

Whiley et al., (2004), autores referenciados no estudo da biologia e diagnóstico da *N. gonorrhoeae*, desenvolveram um ensaio para diagnóstico desta bactéria baseado na detecção do pseudogene *porA*. Este gene existe apenas nas *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*, e não nas espécies saprófitas. Apesar de esse gene possuir regiões homólogas entre as espécies patogênicas, os autores afirmam que cuidadosamente desenharam iniciadores específicos para regiões não homólogas. Entretanto, segundo publicação posterior desses mesmos autores (WHILEY, TAPSALL, SLOOTS, 2006), mesmo que os ensaios sejam comparados com outros métodos de detecção e sejam validados e testados em diferentes populações, pelas características genéticas intrínsecas ao gênero *Neisseria*, o diagnóstico molecular desta bactéria baseada em teste de amplificação de ácidos nucleicos é um desafio contínuo. Outros estudos também têm relatado bons resultados de ensaios de diagnóstico da *N. gonorrhoeae* baseados da detecção do pseudogene *porA* (HJELMEVOLL et al., 2006).

No nosso estudo, utilizamos estes iniciadores desenvolvidos por Whiley et al., (2004), cujo alvo é o pseudogene *porA* bacteriano. Apesar de o ensaio ter sido desenvolvido para PCR em tempo real, utilizamos os iniciadores numa PCR convencional com ajustes nos volumes dos reagentes e tempos de termociclagem. Os iniciadores se mostraram bastante eficazes nos testes preliminares que foram feitos com colônias bacterianas puras de *N. gonorrhoeae*, sendo negativas para colônias de *Treponema pallidum* e DNA purificado advindo de amostras clínicas positivas para HPV. Os iniciadores amplificaram bandas únicas de cerca de 132 pb. A enzima utilizada foi a *Platinum® Taq DNA Polymerase* (INVITROGEN), que possui a tecnologia *Hot Start*, que evita a amplificação de produtos inespecíficos.

A literatura aponta como principais fatores de risco a idade precoce da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais, troca de parceiros, relação com parceiro infectado e uso infrequente de preservativo (PIAZZETTA et al., 2011).

Em nossa amostra, devido a baixa frequência absoluta encontrada (n=5), pouco se pode inferir a respeito das características do grupo infectado. Praticamente

não houve diferenças relativas ao grau de escolaridade, estado civil e apresentação de queixas clínicas, com $p=0,611$, $p=0,319$ e $p=0,585$, respectivamente.

Em relação a apresentação de queixas clínicas, das 5 mulheres positivas, 3 apresentaram queixas, que foram: dificuldade de urinar, corrimento, prurido e dor pélvica, sendo que uma das mulheres exibiu todos os 4 sintomas (Amostra 320), uma mulher exibiu 3 sintomas (Amostra 268) e a outra exibiu apenas corrimento (Amostra 234). Duas mulheres positivas para *N. gonorrhoeae* estavam completamente assintomáticas. Estes dados estão de acordo com o que traz a literatura, tanto em relação aos clássicos sintomas de infecção pelo gonococo quanto sobre a possibilidade de existirem mulheres assintomáticas. Nestas mulheres, a infecção silenciosa e não-tratada ascendente pode ocorrer entre 10 a 20% dos casos podendo resultar em DIP, que pode manifestar-se como salpingite, endometrite, abscesso tubo-ovariano, que pode levar a gravidez ectópica, esterilidade e dor crônica (NG, MARTIN, 2005; PELLATI et al., 2008; SCHIELKE, FROSCH, KURZAI, 2010).

Poderia-se pensar na possibilidade dessas mulheres positivas assintomáticas terem tido uma infecção prévia por *N. gonorrhoeae* e tenham sido tratadas, de forma que restos de material genético bacteriano presentes pudessem ser amplificados durante a PCR com consequente resultado positivo. Porém, nenhuma delas relatou história anterior de infecção pelo gonococo. Semelhantemente, nenhuma mulher sintomática relatou infecção passada pela bactéria.

A análise contrária também é interessante. Das 19 mulheres do nosso estudo que referiram ter tido relações sexuais nos últimos 12 meses com parceiros que tinham história prévia de DST, 11 delas (57,8%) relataram ter sido a doença gonorréia. Como todas as 19 mulheres foram negativas para *N. gonorrhoeae* neste estudo, isto pode ser devido a essa doença prévia ter sido muito antiga na história do parceiro e/ou ter sido tratada com eficiência, provavelmente tendo sido sintomática.

Foi observada uma média de idade menor nas mulheres infectadas com gonococo ($33,8 \pm 21,1$ anos) em relação às não infectadas ($36,5 \pm 13,3\%$), sem apresentar, no entanto, diferença estatisticamente significativa ($p=0,660$) entre os grupos. Semelhantemente, a idade da primeira relação sexual nas mulheres

infectadas com *N. gonorrhoeae* foi 15,6 (DP=3,7) anos e do grupo não infectado foi 15,9 (DP=2,5) anos, com $p=0,783$.

Ainda a respeito do comportamento sexual, quatro mulheres infectadas afirmaram ter tido de 1 a 5 parceiros sexuais ao longo da vida, e 1 afirmou ter tido mais de 10. Nenhuma associação com outros fatores de risco citados na literatura (como número de parceiros fixos e eventuais, uso inconsistente do preservativo com parceiros fixos ou eventuais, etc) foi encontrada ($p>0,05$).

Apesar de a literatura relatar certo grau de co-infecção entre o gonococo e a clamídia, em nossa amostra não encontramos nenhum caso. Se aqui no Brasil o rastreamento para clamídia é um assunto controverso, o rastreamento conjunto clamídia/gonococo é mais polêmico ainda. O fato da infecção pelo gonococo ser mais rara e as manifestações clínicas mais evidentes (não é uma infecção tão silenciosa como a clamídia), o rastreamento em geral é desaconselhado.

6.8 – Infecção pelo *Trichomonas vaginalis*

Os estudos de prevalência de infecção pelo *T. vaginalis* são bem escassos no Brasil. Além de não ser de notificação compulsória, as sequelas pouco graves desta infecção como se acreditava até recentemente, não faziam dela alvo de controle e atenção pelos sistemas de saúde. Apenas atualmente, porém, com o conhecimento da sua relação com a infecção pelo HIV, mais atenção tem sido dada a este patógeno.

Em nosso estudo, o *T. vaginalis* foi o segundo patógeno mais encontrado, com prevalência de 12,7%. Os poucos estudos brasileiros sobre o tema dificultam a comparação desse achado com outros dados nacionais, tanto em termos de populações representadas nos estudos quanto em relação aos métodos diagnósticos utilizados. Em nossa pesquisa bibliográfica, encontramos apenas o estudo brasileiro de Luppi et al., (2010) que utilizou um método molecular (PCR) para diagnóstico. Estes autores, estudando uma amostra semelhante a nossa, encontraram 3,2% de infecção nas mulheres em exame ginecológico de rotina na cidade de São Paulo/SP, prevalência muito abaixo da encontrada em nosso estudo.

Os métodos diagnósticos mais comumente empregados nos estudos e na prática clínica são a cultura, a citologia e o exame a fresco. Considerando estes métodos, os dados de prevalência brasileiros variam entre 2,0 a 8,9% em mulheres em exame de rotina. Em nosso estudo, no exame citológico foram identificadas apenas 3 mulheres (0,8%) infectadas por *T. vaginalis*, todas estas também positivas ao exame molecular, evidenciando uma maior sensibilidade deste último, uma vez que foi encontrada infecção em 46 mulheres (12,7%) através de PCR. Em mulheres HIV-positivas, porém, estes números são maiores; Oliveira et al., (2008b) encontraram 12,5% de positividade na cidade de Salvador/BA e Lemos (2008) encontrou 18,4% em mulheres HIV-positivas em Goiânia/GO.

Embora haja essa lacuna de estudos brasileiros que utilizem ferramentas moleculares de diagnóstico, a PCR e a PCR em tempo real são métodos frequentemente empregados nos estudos internacionais. A PCR para o diagnóstico do *T. vaginalis* se mostra bastante sensível, variando neste quesito de 81 a 97%, excedendo todos os anteriores, até mesmo a cultura (MADICO et al., 1998; CALIENDO et al., 2005; VAN DER POL, KRAF, WILLIAMS, 2006; MILLER et al., 2008; VAN DER POL et al., 2008; HOLLMAN et al., 2010).

O clássico estudo de Madico et al., (1998) comparando estes métodos mostrou que, amostras vaginais de 350 mulheres foram analisadas e a cultura detectou *T. vaginalis* em 6,6% das amostras, enquanto a PCR detectou o parasita em 39% das amostras. Foram realizadas 2 reações de PCR, uma com os iniciadores BTU9/BTUB2, desenhados por estes autores, que amplificam uma região do gene da beta-tubulina do parasita e a segunda confirmatória com os iniciadores TVA 5-1/6 ou com os iniciadores AP65 A/B, anteriormente descritos por outros autores (MADICO et al., 1998).

Em nosso estudo, utilizamos o par de iniciadores BTUB2/BTUB9 desenvolvidos por Madico et al., (1998) bem como todo o protocolo por ele descrito neste estudo, isto é, uma *PCR-touchdown*. A *PCR-touchdown* é uma variação de PCR em que há a diminuição da temperatura de anelamento de forma sequencial até uma determinada temperatura, a qual é supostamente a ideal. A manutenção da temperatura de anelamento mais alta nos ciclos iniciais (aumento da estringência) ajuda a evitar a formação de produtos inespecíficos (RODRIGUES, SILVA,

SIQUEIRA, 2006). Em relação à prevenção da formação de produtos inespecíficos, utilizamos também a enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* (INVITROGEN), que possui a tecnologia *Hot Start*. As bandas formadas foram únicas e bem visíveis no gel de agarose a 2,0%, com tamanho de cerca de 112 pb, como esperado.

Os principais fatores de risco para infecção do *T. vaginalis* citados na literatura são: grande número de parceiros sexuais, iniciação sexual precoce, baixo nível educacional, pobreza e uso de ducha vaginal. Há uma prevalência maior em mulheres da raça negra e mulheres não tão jovens (acima de 30 anos), diferente da *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*, que acometem mais adolescentes e adultas jovens (SHAFIR, SOVILLO, SMITH, 2009; SUTTON et al., 2007; MILLER et al., 2008).

Em nosso estudo observamos maior prevalência de infecção em mulheres com menor nível de escolaridade: 15,7% das mulheres com ensino fundamental incompleto estavam infectadas contra 10,4% das que tinham ensino fundamental completo, sem contudo essa diferença exibir significância estatística ($p=0,132$). Em relação à idade, observou-se uma média de idade maior entre as mulheres infectadas ($38,9\pm 15,2$ anos) em relação às não infectadas ($36,1\pm 13,1$ anos) ($p=0,175$). Quando analisamos as faixas etárias, curiosamente encontramos a maior prevalência na faixa etária acima de 64 anos (18,8%), seguida da faixa etária de 18 e 24 anos (17,1%).

Observamos prevalências de infecção pelo *T. vaginalis* muito próximas entre os grupos de mulheres solteiras/separadas/viúvas (12,2%) e casadas/união estável (12,9%) ($p=0,866$). Quando analisamos o número de parceiros sexuais ao longo da vida, observamos maior prevalência no grupo de mulheres que relatou ter tido acima de 10 parceiros (21,4%) em relação aos grupos que relataram entre 6 e 10 parceiros (12,2%) e de 1 a 5 (12,0%), contudo, sem associação estatística significativa ($p=0,357$).

Outras variáveis de comportamento sexual analisadas (idade da primeira relação sexual, número de parceiros fixos e eventuais nos últimos 12 meses, uso inconsistente de preservativo tanto com parceiros fixos quanto eventuais, história prévia de DST e relacionamento com parceiros que relataram história prévia de DST) também não mostraram associação com a infecção pelo *T. vaginalis* ($p\geq 0,05$).

As duas mulheres HIV-positivas em nosso estudo apresentaram-se negativas para *T. vaginalis*.

Das 46 mulheres infectadas, apenas 21 delas (45,6%) queixaram-se de sintomas clínicos, que foram: dor pélvica (n=14), corrimento vaginal (n=10), prurido (n=6) e dor ao urinar (n=3), com algumas mulheres apresentando mais de uma queixa. Estes sintomas estão de acordo com a literatura (BRAVO et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2010). O grande número de mulheres infectadas que não relataram sintomatologia (n=25, correspondente a 54,3% das mulheres positivas) é intrigante, pois este é um patógeno que costuma provocar sintomas acentuados. Porém este achado está também de acordo com a literatura, pois alguns autores afirmam que esta infecção pode ser assintomática em cerca da metade dos casos (McCLELLAND, 2008; MILLER et al., 2008; HOLLMAN et al., 2010). Era possível pensar que as mulheres infectadas que não exibiram sintomatologia poderiam se tratar de mulheres previamente infectadas e que foram tratadas, mas não completaram o regime de tratamento (no caso, por exemplo, quando o profissional faz a opção de prescrever pomada vaginal por vários dias, e a mulher não completa o regime de tratamento, abandonando-o logo quando sai da fase sintomática). Porém, quando analisamos a história prévia de DST dessas mulheres assintomáticas, verificamos que apenas 3 delas relataram infecção prévia pelo *T. vaginalis*, e 22 não relataram, e apenas 1 mulher assintomática relatou história de relacionamento com parceiro com infecção passada pelo *T. vaginalis*.

Deve ser dada certa atenção à infecção assintomática pelo *T. vaginalis*, uma vez que este patógeno tem sido recentemente implicado com problemas na saúde reprodutiva, como nascimento a pré-termo, neoplasia cervical, infecção pós-histerectomia, infertilidade, DIP e principalmente, predisposição à contaminação pelo HIV (McCLELLAND, 2008).

Mesmo em países desenvolvidos, que já têm programas elaborados de rastreamento para outros patógenos sexualmente transmissíveis, como os Estados Unidos e alguns países europeus, o rastreamento do *T. vaginalis* em indivíduos assintomáticos não tem sido assunto prioritário em saúde pública, pois como citado, até recentemente, a infecção era tida como benigna e auto-limitada (HOLLMAN et al., 2010). Neste sentido, estudos como o de Van Der Pol, Kraft, Williams (2008),

que adaptaram com sucesso o uso do *kit* diagnóstico da Roche para clamídia e gonococo (*Roche Cobas Amplicor CT/NG Assay*) com a introdução de iniciadores para *T. vaginalis* para detecção deste patógeno, têm sido feitos, na tentativa de se incorporar a detecção do *T. vaginalis* na rotina laboratorial, usando uma só amostra, facilitando as possibilidades do rastreamento.

Considerando as estimativas da Organização Mundial de Saúde de que a prevalência de casos de tricomoníase varie mundialmente entre 170 a 190 milhões de casos por ano (estimativas baseadas na suposição de que a sensibilidade do exame a fresco varie entre 60 a 80%, quando na verdade varia entre 30 a 60%, estando essas estimativas, portanto, baixas), a autora Van Der Pol (2007) pergunta: “...Contudo, mesmo se tomarmos estas estimativas como verdadeiras, por que tão pouca atenção é dada ao fato de que a prevalência do *T. vaginalis* sozinho é igual às estimativas da *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* juntas?”, questionando o por que da “mais prevalente infecção sexualmente transmissível não-viral ser a última a receber atenção em Saúde Pública”.

6.9 – Considerações finais

O conhecimento da prevalência das DST com informações detalhadas e regionalizadas é de grande importância para profissionais que atuam diretamente com o público portador das doenças, para alunos e professores universitários na organização de um currículo minimamente voltado para as realidades regionais, para gestores de programas de controle das DST, dentre outros atores envolvidos no assunto.

De relevante importância epidemiológica, neste estudo apontamos a alta prevalência encontrada de infecção pelo HPV nesta amostra de população feminina do município de Coari (29,1%), sendo que destas, 58,1% estavam infectadas por HPV 16, um HPV de alto risco oncogênico. Isso é bastante preocupante, considerando que as estimativas do INCA para o estado do Amazonas este ano é de que o câncer de colo de útero será a neoplasia maligna mais incidente em mulheres, ficando a frente das clássicas neoplasias malignas que mais acometem as mulheres no mundo inteiro (câncer de pele não melanoma e câncer de mama). Temas como

uma maior e mais eficiente cobertura de rastreamento pelo Papanicolaou e a inclusão da vacina anti-HPV no calendário vacinal são assuntos, portanto, que certamente não sairão de pauta nos próximos anos.

Em especial, o assunto da vacina anti-HPV ainda traz mais à tona a necessidade de mais laboratórios e grupos de pesquisa analisarem os perfis de prevalência dos tipos virais mais comumente encontrados considerando as diferenças regionais. Isto porque o HPV 18 é conhecidamente pouco prevalente não só no Brasil, mas praticamente em toda América Latina. No Amazonas, a tendência parece ser a mesma, com ênfase maior no HPV 58 e HPV 33, como mostram os estudos anteriormente citados. Temos, portanto, vacinas eficazes disponíveis no mercado, e importantes porque combatem o HPV 16, o mais prevalente nesses estudos. Porém, é uma vacina “europeizada” ou “norte-americanizada”, uma vez que é eficaz também contra o HPV 18, um vírus pouco prevalente no Brasil. Certamente, a produção de uma vacina mais regionalizada e contextualizada aos tipos virais mais encontrados aqui certamente configura-se como uma boa perspectiva biotecnológica.

Enfatizamos também no município de Coari a alta prevalência de DST curáveis entre as mulheres estudadas. Para a Organização Mundial de Saúde, as DST representam ônus para uma população quando a prevalência das DST curáveis na população em geral se situa em, ou cerca de, 5% (além de mais dois outros critérios, que são: quando a prevalência de sífilis em gestantes é maior ou igual a 1% e quando a prevalência das DST curáveis é maior que 10% em certas subpopulações (profissionais do sexo, jovens, usuários de drogas injetáveis e outras)) (BRASIL, 2008). Das quatro DST curáveis (gonorréia, clamídia, sífilis e tricomoníase), três delas foram estudadas nesta pesquisa (gonorréia, clamídia e tricomoníase), tendo sido encontrado que duas delas, a clamídia e a tricomoníase exibiram prevalência acima desse limite de 5% (6,4% e 12,7%, respectivamente). Isso aponta para a possibilidade dessas DST estarem verdadeiramente representando um ônus para o sistema de saúde do município de Coari. Adicionalmente a isso, essa alta prevalência de DST mostra-se como fator de risco elevado para aquisição do HIV.

Semelhantemente, a significativa prevalência encontrada do Citomegalovírus Humano (8,3%) nas amostras cervicais das mulheres em exame ginecológico de rotina neste município serve como um alerta a respeito da importância do não relaxamento do pedido da sorologia para este patógeno durante o pré-natal, pois a infecção por este vírus é muitas vezes silenciosa e seus sintomas quase sempre inespecíficos.

O conhecimento da situação epidemiológica das DST poderia ser a base para a implementação de tratamento e de estratégias de rastreamento. O rastreamento de indivíduos assintomáticos é parte importante de qualquer estratégia de controle das DST. Embora tecnologicamente haja possibilidade para o controle das DST, principalmente com o funcionamento de uma rede de rastreamento organizada e eficiente e com o uso de tecnologia avançada para diagnóstico (incluindo o uso de técnicas moleculares como as usadas neste trabalho) como acontece em países desenvolvidos, no Brasil essa realidade ainda parece estar longe. Com exceção da captura híbrida para detecção de *C. trachomatis*, aqui ainda não há disponibilidade desses métodos de detecção modernos e mais sensíveis em relação à maioria das técnicas diagnósticas tradicionais para a população em geral.

O interior do estado do Amazonas certamente se apresenta como uma região de difícil implementação de ações de rastreamento com máxima eficiência, principalmente devido à sua grande dimensão e suas particularidades geográficas, embora isso não seja de todo impossível. Nesta realidade, o uso de métodos rápidos de diagnóstico (teste-rápido) que não necessitem de equipamentos sofisticados ou refrigeração ou ainda de pessoal qualificado, que possa ser aplicável em populações mais pobres e/ou de difícil acesso, poderia ser a melhor solução para o primeiro momento do rastreamento. Porém, muitos desses testes necessitam ser aprimorados tanto em relação à sua sensibilidade quanto à sua especificidade, ao contrário dos testes moleculares, que já apresentam bastante vantagem nesses dois quesitos (GREER, WENDEL, 2008; SIEMER et al., 2008).

Mesmo que a introdução do uso sistemático de técnicas laboratoriais mais sofisticadas e sensíveis (como a Biologia Molecular) para detecção de patógenos sexualmente transmissíveis seja um motivo de grande debate, devido principalmente ao maior custo imediato ao sistema de saúde, estudos de custo-benefício que

focalizem o diagnóstico precoce e preciso desses patógenos são bastante necessários e bem-vindos.

Nesta perspectiva, foi proposto ao Parque Científico e Tecnológico para Inclusão Social, ligado à Pro-reitoria de Inovação Tecnológica desta Universidade um projeto para criação de um posto avançado de diagnóstico de DST no município de Coari/AM. Este posto, se aprovado, será muito importante para continuidade dos estudos e experimentos relacionados aos patógenos sexualmente transmissíveis cíclicos nesta região do estado, bem como para possivelmente a criação de um *kit* diagnóstico do tipo *multiplex*, considerando os resultados obtidos neste estudo preliminar.

7. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos neste estudo em uma amostra proveniente de mulheres em exame ginecológico de rotina atendidas na Atenção Primária à Saúde no município de Coari/AM, conclui-se que:

1. A prevalência das infecções sexualmente transmissíveis estudadas foi de 47,8%.
2. Ao exame citológico, 97,8% das mulheres exibiram citologia normal, 1,2% exibiram ASCUS, 0,6% apresentou HSIL e 0,3% exibiu LSIL.
3. A prevalência de HPV foi de 29,1%, tendo sido identificados 15 tipos de HPV por sequenciamento gênico, cujos principais tipos encontrados foram: HPV 16 (58,1%) e HPV 58 (20,0%). Os outros 13 tipos de HPV encontrados foram: HPV 33, HPV81, HPV 6, HPV 70, HPV 31, HPV 35, HPV 45, HPV 52, HPV 53, HPV 61, HPV 68, HPV 71 e HPV 89.
4. Dentre as mulheres com citologia normal, 31,8% estavam infectadas pelo HPV. Dentre as 7 mulheres que apresentaram anormalidades citológicas, 5 (71,4%) mostraram infecção por HPV.
5. Os dois herpes vírus estudados exibiram prevalência de 8,3% para o Citomegalovírus Humano e 0,6% para o Herpes Vírus Simples 2, embora pelas características próprias à biologia desses vírus, é provável que estes números estejam sub-estimados.
6. As bactérias *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* exibiram prevalência de 6,4% e 1,4%, respectivamente.
7. A prevalência do *T. vaginalis* foi de 12,7%.
8. Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a infecção pelos patógenos e as variáveis sócio-econômicas, comportamentais e história clínica das mulheres.

Referências:

- ADLER, S.P. Screening for Cytomegalovirus during pregnancy. **Infec Dis Obstet Gynecol**, v.2011, p.1-9, 2011.
- ALANEN, A.; KAHALA, K.; VAHLBERG, T.; KOSKELA, P.; VAINIONPAA, R. Seroprevalence, incidence of prenatal infections and reliability of maternal history of varicella zoster vírus, cytomegalocirus herpes simplex vírus and parvovirus B19 infectin in South-Western Finland. **BJOG: Inter J Obstet Gynecol**, v.112, p.50-56, 2005.
- ARANGO, H.G. **Bioestatística Teórica e Computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- BARCELOS, M.R.B.; VARGAS, P.R.M.; BARONI, C.; MIRANDA, A.E. Infecções genitais em mulheres atendidas em Unidade Básica de Saúde: prevalência e fatores de risco. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.30, n.7, p349-354, 2008.
- BARRETO, N.A.; SANT'ANNA, R.R.P.; SILVA, L.B.G. et al. Caracterização fenotípica e molecular de *Neisseria Gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro, 2002-2003. **DST- J bras Doenças Sex Transm**, v.16, n.2, p.32-42, 2004.
- BAYRAM, A.; ÖZKUR, A.; ERKILIC, S. Prevalence of human cytomegalovirus co-infection in patients with chronic viral hepatitis B and C: a comparison of clinical and histological aspects. **Journal of Clinical Virology**, n.43, p.212-217, 2009.
- BÉBÉAR, C.; BARBEYRAC, B. Genital Chlamydia trachomatis infections. **Clin Microbiol Infect**, v.15, p.4-10, 2009.
- BENZAKEN, A.S.; GALBAN, E.G.; ANTUNES, W.; DUTRA, J.C.; PEELING, R.W.; MABEY, D.; SALAMA, A. Diagnosis of gonococcal infection in high risk women using a rapid test. **Sex Transm Infect**, v. 82, p.26-28, 2006.
- BENZAKEN, A.S.; GALBAN, E.; MOHERDANI, F. et al. Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* e fatores associados em diferentes populações de ambos os sexos na cidade de Manaus. **DST – J Bras Doenças Sex Transm**, v.20, n.1, p. 18-23, 2008.
- BENZAKEN, A.S.; SALES, D.N.; PALHETA JÚNIOR, J.I.L.; PEDROZA, V.L.; GARCIA, E.G. Prevalência da infecção por Clamídia e Gonococo em mulheres atendidas na clínica de DST da Fundação Alfredo da Mata, Manaus, Amazonas. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v.22, n.3, p.129-134, 2010.
- BERGEN, J.E.A.M; SPAARGAREN, J.; GOTZ, HM. et al. Population prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in the Netherlands. Should asymptomatic person be tested during population-based Chlamydia creening also for gonorrhoeae or only if chlamydial infection is found? **BMC Infec Dis**, v.6, p.42-47, 2006.

BERNARD, H. The clinical importance of nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **J Clin Virol**, v.32S, p. S1-S6, 2005.

BIRI, A.; BOZDAYI, G.; ÇIFTÇI, B.; DINÇ, B.; YUCEL, A.; ROTA, S. The detection of CMV in amniotic fluid and cervicovaginal smear samples by real-time PCR assay in prenatal diagnosis. **Arch Gynecol Obstet**, v.273, p.261-266, 2006.

BOECKH, M.; GEBALLE, A.P. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. **J Clin Invest**, n.121, n.5, p.1673-1680, 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Plano integrado de enfrentamento da feminização da epidemia de AIDS e outras DST. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. DST e AIDS. Elaborado por: Núcleo de Estudos em Saúde do Adolescente – NESA/UERJ. Disponível em: [HTTP://www.portal.saude.gov.br](http://www.portal.saude.gov.br). Acessado em: 17/08/2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. Rastreamento. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2011.

BRAVO, R.S.; GIRALDO, P.C.; CARVALHO, N.S. et al. Tricomoniase vaginal: o que se passa? **DST - J Bras Doenças Sex Transm**, v.22, n.2, p.73-80, 2010.

BURD, E.M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n.1, p.1-17, 2003.

CALLEJA-MACIAS, I.E.; VILLA, L.L.; PRADO, J.C. et al. Worldwide genomic diversity of the high-risk human Papillomavirus types 31, 35, 52 and 58, four close relatives of Human Papillomavirus type 16. **J Virol**, v.79, n.21, p.13630-13640, 2005.

CALIENDO, A.M.; JORDAN, A.M.; GREEN, A.M. et al. Real-time PCR improves detection of Trichomonas vaginalis infection compared with culture using self-collected vaginal swabs. **Infec Dis Obstet Gynecol**, v.13, n.3, p.145-150, 2005.

CAMARA, G.N.L.; CERQUEIRA, D.M.; OLIVEIRA, A.P.G. et al. Prevalence of Human Papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.98, n.7, p.870-883, 2003.

CANCHE, J.C.; LÓPEZ, I.R.; SUÁREZ, N.G. et al. High prevalence and low E6 genetic variability of Human Papillomavirus 58 in women with cervical cancer and precursors lesions in Southeast Mexico. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, p.144-148, 2010.

CARVALHO, M.C.S.; PANNUTI, C.S.; SUMITA, L. M.; SOUZA, V.A.F.S. Prevalence of herpes simplex type 2 antibodies and a clinical history of herpes in three different populations in Campinas city, Brazil. **Int J Infect Dis**, v.3, p.94-98, 1999.

CASTRO, M.M.; FARIAS, I.P.; BORBOREMA-SANTOS, C.M. et al. Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **Gen Mol Research**, v. 10, n.1, p.186-196, 2011.

CEVENINI, R.; DONATI, M.; SAMBRI, V. Chlamydia trachomatis – the agent. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v.16, n.6, p. 761-773, 2002.

CHENG, A.; QIAN, Q.; KIRBY, J.E. Evaluation of the Abbott RealTime CT/NG assay in comparison to the Roche Cobas Amplicor CT/NG assay. **J Clin Microbiol**, v. 49, n.4, p.1294-1300, 2011.

CLEARY, K.L.; PARÉ, E.; STAMILIA, D.; MACONES, G. Type-specific screening for asymptomatic herpes infection in pregnancy: a decision analysis. **BJOG: Inter J Obstet Gynecol**, v.112, p.731-736, 2005.

CLEMENS, S.A.C.; FARHAT, C.K. Seroprevalence of herpes simplex 1-2 antibodies in Brazil. **Rev Saúde Pública**, v.44, n.4, 2010.

CODES, J.S.; CONEH, D.A.; MELO, N.A et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. **RBGO**, v.24, n.2, 101-106, 2002.

CODES, J.S.; COHEN, D.A.; MELO, N.A. et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.22, n.2, p.325-334, 2006.

CONTI, C.; MALACRINO, C.; MASTROMARINO, P. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli. **J Physiol Pharmacol**, v.60, n.6, p.19-26, 2009.

COREY, L.; HUANG, M.; SELKE, S.; WALD, A. Differentiation of Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 in clinical samples by a real-time Taqman PCR assay. **J. Med. Virol.**, v.76, p.350-355, 2005.

CORNETTA, M.C.M.; GONÇALVES, A.K.S.; BERTINI, A.M. Efficacy of cytology for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women. **The Braz J Infec Dis**, v.10, n.5, p.337-340, 2006.

CORRÊA, G.J. Prevalência do Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres portadoras de lesão intraepitelial cervical e câncer invasor. 2005. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais e Infeciosas) – **Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais e Infeciosas**, Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

COWAN, F.M.; FRENCH, R.S.; MAYAUD, P.; et al. Seroepidemiologia study of herpes simplex virus types 1 and 2 in Brazil, Estonia, India, Morocco, and Sri Lanka. **Sex Transm Infect**, v.79, p.286-290,

2003.

CUNHA, A.A.; MARIN, L.J.; AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L.T.M. Diagnosis of cytomegalovirus infections by qualitative and quantitative PCR in HIV infected patients. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.44, n.3, p.127-132, 2002.

de RODA HUSMAN, A.M.; WALBOOMERS, J.M.; van den BRULE, A.J.; MEIJER, C.J.; SNIJDERS, P.J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves Human Papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol**, v.76, p.1057-1062, 1995.

de VILLIERS, E.M.; FAUQUET, C.; BROKER, T.R.; BERNARD, H.U.; zur HAUSEN H. **Classification of Papilloviruses**. *Virology*, v.324, p.17-27, 2004.

DINC, B.; BOZDAYI, G.; BIRI, A. et al. Molecular detection of cytomegalovirus, herpes simplex virus 2, Human Papillomavirus 16-18 in Turkish pregnant. **Braz J Infect Dis**, v.14, n.6, p.569-574, 2010.

DOLAN, A.; JAMIESON, F.E.; CUNNINGHAM, C.; BARNETT, B.C.; McGEOCH, D.J. The genome sequence of herpes simplex virus type 2. **J Virol**, v.72, n.3, p.2010-2021, 1998.

DONATI, L.; DI VICO, A.; NUCI, M. et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. **Arch Gynecol Obstet**, v.281, p. 589-600, 2010.

DOOBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**, v.32S, p.S7-S15, 2005.

EPI-INFO, versão 3.5.3 for Windows. CDC, Califórnia, 1997.

FERNANDES, A.M.S.; DAHER, G.; NUZZI, R.X.P.; PETTA, C.A. Infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres atendidas em serviço de planejamento familiar. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.31, n.5, p.235-240, 2009.

FERREIRA, J.R.D. **Deteção da infecção pelo HPV e do polimorfismo da proteína p53 em pacientes com lesões cervicais atendidas na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas**. Manaus: UFAM, 2007. Dissertação (mestrado em Patologia Tropical), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, 2007a.

FERREIRA, W.A.; VASCONCELOS, W.S.; SILVA, M.F.P et al. Resistência da *Neisseria gonorrhoeae* a antimicrobianos em Manaus: período de 2005-2006. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v.19, n.2, p.65-69, 2007b.

FINAN, R.R.; TAMIM, H.; ALMAWI, W.Y. Identification of *Chlamydia trachomatis* DNA in human papillomavirus (HPV) positive women with normal and abnormal cytology. **Arch Gynecol Obstet**, v.266, p.168-171, 2002.

FRANÇA JR. I.; PAIVA, V.; LOPES, F.; VENTURI, G. 1- **Aspectos metodológicos e analíticos da pesquisa MS/IBOPE – 2003**. Acessado em 25/06/2007 em www.aids.gov.br.

FREDIZZI, E.N.; SCHLUP C.G.; MENEZES, M.E.; OCAMPOS, M. Infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v.20, n.2, p.73-79, 2008.

FREDLUND, H.; FALK, L.; JURSTRAN, M.; UNEMO, M. Molecular genetic methods for diagnosis and characterization of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. **APMIS**, v.112, p.771-784, 2004.

FREITAS, N.S.L.; BORBOREMA-SANTOS, C.M.; NEVES, D.B.S.; OLIVEIRA, C.M.C.; FERREIRA, J.R.D.; ASTOLFI-FILHO, A. High prevalence detection of *Chlamydia trachomatis* by Polymerase Chain Reaction in endocervical samples of infertile women attending University Hospital in Manaus-Amazonas, Brazil. **Gynecol Obstet Invest**, v.72, n.4, p.220-226, 2011.

GERNA, G.; BALDANTI, F.; REVELLO, M.G. Pathogenesis of Human Cytomegalovirus Infection and cellular targets. **Human Immunology**, v.65, n.381-386, 2004.

GIRALDO, P.C.; SILVA, M.J.P.M.A.; FREDIZZI, E.N. et al. Prevenção da infecção por HPV e lesões associadas com o uso de vacinas. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v.20 n.2, p.132-140, 2008.

GOMES, C.M.M.; GIRALDO, P.C.; GOMES, F.A.M.; AMARAL, R.; PASSOS, M.R.L.; GONÇALVES, A.K.S. Genital ulcers in women: clinical, microbiologic and histopatologic characteristics. **Braz J Infec Dis**, v.11, n.2, p.254-260, 2007.

GREER, L.; WENDEL, G.D. Rapid Diagnostic Methods in Sexually Transmitted Infections. **Inf Dis Clin N Am**, v.22, p.601-617, 2008.

GUILHEN, D.; AZEVEDO, A.F. Bioética e gênero: moralidade e vulnerabilidade feminina no contexto da AIDS. **Rev Bioética**, v.16, n.2, p.229-240, 2008.

GUIMARÃES, E.M.B.; GUIMARÃES, M.D.C; VIEIRA, M.A. et al. Lack of utility of risk score and gynecological examination for screening for sexually transmitted infections in sexually active adolescents. **BMC Medicine**, v.7, p.8-13, 2009.

HADGU, A.; STERNBERG, M. Reproducibility and specificity concerns associated with nucleic acid amplification test for detecting *Chlamydia trachomatis*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.28, p.9-15, 2009.

HARKINS, A.L.; MUNSON, E. Molecular diagnosis of sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* in the United States. **ISRN Obstet Gynecol**, v.2011, p.279149, 2011.

HERNÁNDEZ, H.M.; SARRIEGO, I.; ALVAREZ, A.B. et al. *Trichomonas vaginalis* 62 kDa proteinase as a possible virulence factor. **Parasitol Res**, v.108, n.1, p.241-245, 2011.

HJELMEVOLL, S.; OLSEN, M.E.; SOLLID, J.U.E. A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene. **J Mol Diagn**, v.8, p.574-581, 2006.

HO, M. The history of cytomegalovirus and its diseases. **Med Microbiol Immunol**, n.197, p.65-73, 2008.

HOLLMAN, D.; COUPEY, S.M.; FOX, A.S.; HEROLD, B.C. Screening for *Trichomonas vaginalis* in high-risk adolescent females with a new transcription-mediated nucleic acid amplification test (NATTS): associations with ethnicity, symptoms, and prior and current STI. **J Pediatr Adolesc Gynecol**, v.23, p.312-316, 2010.

HONEY, E.; AUGOOD, C.; TEMPLETON, A. et al. Cost effectiveness of screening for *Chlamydia trachomatis*: a review of published studies. **Sex Transm Infect**, v.78, p.406-412, 2002.

IGANSI, C.N. Prevalência de Papilomavírus Humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre, Brasil. Dissertação (mestrado). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2005.

INAGAKI, A.D.M.; OLIVEIRA, L.A.R.; OLIVEIRA, M.F.B.; SANTOS, R.C.S.; ARAÚJO, R.M.; ALVES, J.A.B. et al. Soroprevalência de anticorpos contra toxoplasmose, rubéola, cytomegalovirus, sífilis e HIV em gestantes sergipanas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.42, n.5, p.532-536, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (BRASIL). COORDENAÇÃO GERAL DE AÇÕES ESTRATÉGICAS. DIVISÃO DE APOIO À REDE DE ATENÇÃO ONCOLÓGICA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer de colo de útero. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

JALIL, E.M.; PINTO, V.M.; BENZAKEN, A.S. et al. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.30, n.12, p.614-619, 2008.

JIMÉNEZ, A.L.; GOTLIEB, S.L.D.; HARDY, E.; ZANEVELD, L. J.D. Prevenção de doenças sexualmente transmissíveis em mulheres: associação com variáveis sócio-econômicas e demográficas. **Cad. Saúde Pública**, v.17, n.1, p.55-62, 2001.

JOHNSTON, V.J.; MABEY, D.C. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. **Curr Opin Infect Dis**, v.21, p.56-64, 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran. Patologia – bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAN, J.; WALBOOMERS, J.M.M.; ROOSENDAAL, R. et al. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reactions and restriction fragment length polymorphism analysis. **J Clin Microbiol**, v.31, n.5, p.1060-1065, 1993.

LANDOLFO, S.; GARIGLIO, M.; GRIBAUDO, G.; LEMBO, D. The human cytomegalovirus. **Pharmacol & Therapeut**, v.98, p.269-297, 2003.

LEINONEN, M.; NIEMINEN, P.; KOTAMIENI-TALONEN, L. et al. Age-specific evaluation of primary humanpapillomavirus screening vs conventional cytology in a randomized setting. **JNCI**, v.101, n.23, p.1612-1623, 2009.

LEMOS, P.A.P. Ocorrência da infecção pelo *Trichomonas vaginalis* em mulheres HIV-positivas e negativas atendidas em hospitais de referência em Goiânia, Goiás, Brasil. Dissertação (mestrado). **Universidade Federal de Goiás**, 2008.

LEUNG, A.K.C.; SAUVE, R.S.; DAVIES, H.D. Congenital Cytomegalovirus infection. **J Nat Med Assoc**, v.95, n.3, 2003.

LIMA JR.,S.F.; FERNANDES, M.C.M.; HERÁCLITO, S.A.; SOUZA, P.R.E.; MAIA, M.M.D. Prevalência de genótipos de Papilomavírus Humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil. **RBGO**, v.33, n.10, p.315-320, 2011.

LIPPMAN, S.A.; SUCUPIRA, M.C.A.; JONES, H.E. et al. Prevalence, distribution and correlates of endocervical Human Papillomavirus types in Brazilian women. **Int J STD AIDS**, v.21, n.2, p.105-109, 2010.

LOGAN, S.; BROWNE, J.; MCKENIE, H.; TEMPLETON, A.; BHATTACHARYA, S. Evaluation of endocervical, first-void urine and self-administered vulval swabs for the detection of *Chlamydia trachomatis* in a miscarriage population. **Inter J Obstet Gynaecol**, v.112, p.103-106, 2005.

LUPPI, C.G.; OLIVEIRA, R.L.S.; VERAS, M.A. et al. Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária. **Rev Bras Epidemiol**, v.14, n.3, p.467-477, 2011.

MADICO, G.; QUINN, T.C.; ROMPALO, A.; MCKEE JR, K.T.; GAYDOS, C.A. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swab samples. **J Clin Microbiol**, v.36, n.11, p.3205-3210, 1998.

MAGALHÃES, I.M.; MOYSÉS, N.; AFONSO, L.A.; OLIVEIRA, L.H.S.; CAVALCANTI, S.M.B. Comparação de dois pares de oligonucleotídeos utilizados na reação em cadeia da polimerase para detecção de papilomavírus humanos em esfregaços cervicais. **DST - J. Bras Doenças Sex Transm**, v.20, n. 2, p.93-98, 2008.

MAGBANUA, J.P.V.; GOH, B.T.; MICHEL, C. et al. *Chlamydia trachomatis* variant not detected by plasmidial based nucleic acid amplification tests: molecular characterization and failure of single dose azithromycin. **Sex Transm Infec**, v.83, p.339-343, 2007.

MAHONY, J.B.; LUINSTR, K.E.; SELLORS, J.W.; CHERNESKY, M.A. Comparison of plasmid and chromosome-based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v.31, n.7, p.1753-1758, 1993.

MAITRA, N.; GUPTA, M. Seroprevalence and correlates of herpes simplex type-2 infection in a general gynecology clinic. **Arch Gynecol Obstet**, v.275, p.19-23, 2007.

MANOS, M,N.; TING, Y.; WRIGHT, D.K.; LEWIS, A.J.; BROKER, T.R.; WOLINSKY, S.M. Use of polymerase chain reaction for the detection of genital human papillomaviruses. In: Furth, M. Greaves M, editors. Molecular diagnostics of human cancer. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. p.209-214. (Cancer Cell Series, 7).

MARAL, I.; BIRI, A.; KORUCUOGLU, U.; BAKAR, C.; CIRAK, M. BUMIN, M.A. Seroprevalences of herpes simplex virus type 2 and *Chlamydia trachomatis* in Turkey. **Arch Gynecol Obstet**, v.280, p.739-743, 2009.

MARQUES, C.A.S.; MENEZES, M.L.B.; COELHO, I.M.G.; MARQUES, C.R.C.; CELESTINO, L.C.; LIMA, P.R. Infecção genital por *Chlamydia trachomatis* em casais atendidos em ambulatório de esterilidade conjugal. **DST – J Bras Doenças Sex Transm**, v.19, n.1, p.5-10, 2007.

MASEK, B.J.; ARORA, N.; QUINN, N. Performance of three nucleic acid amplification test for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by use of self-collected vaginal swabs obtained via an internet-based screening program. **J Clin Microbiol**, v.47, n.6, p.1663-1667, 2009.

MATOS, S.B.; MEYER, R.; LIMA, F.W.M. Seroprevalence of cytomegalovirus infection among healthy blood donors in Bahia State, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemater**, v.32, n.1, p.45-49, 2010.

MATTOS, A.T.; FREITAS, L.B.; LIMA, B.M.C.; MIRANDA, A.E.; SPANO, L.C. Diversity and uncommon HPV types in HIV seropositive and seronegative women attending an STI clinic. **Braz J Microbiol**, v.42, p.786-793, 2011.

McCLELLAND, R.S. *Trichomonas vaginalis* infection: can we afford to do nothing? **JID**, v.197, p.487-489, 2008.

MELGAÇO, F.G.; ROSA, M.L.G.; AUGUSTO, E.F. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. **Arch Gynecol Obstet**, v.283, n.4, p.809-817, 2011.

MILLER, M.; LIAO, Y.; GOMEZ, A.M.; GAYDOS, C.A.; D'MELLOW, D. Factors associated with the prevalence and incidence of *Trichomonas vaginalis* infection among African American women in New York City who use drugs. **JID**, v.197, p.503-508, 2008.

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

MOYSÉS, N.; BALTHAZAR, D.S.; AFONSO, L.A.; OLIVEIRA, L.H.S.; CAVALCANTI, S.M.B. Evaluation of the combined use of Papanicolou screen test and the polymerase chain reaction for the identification of patients at risk of cervical cancer. **DST-J Bras Doenças Sex Transm**, v.20, n.2, p.99-103, 2008.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, n.24, s.3, p.1-10, 2006.

MUSA, J.; TAIWO, B.; GOLDSITH, S. et al. Predictors of atypical squamous cell of undetermined significance cervical cytology with high-risk human papilloma virus genotypes. **Arch Gynecol Obstet**, v.283, n.2, p.343-348, 2011.

NG, L-K.; MARTIN, IE. The laboratory diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae*. **Can J Infec Dis Med Microbiol**, v.16, n.1, p.15-25, 2005.

NIGRO, G.; ANCESCHI, M.M.; OSMI, E.V. Clinical manifestations and abnormal laboratory findings in pregnant women with primary cytomegalovirus infection. **BJOG: Inter J Obstet Gynecol**, v.110, p.572-577, 2003.

NOVAIS, C.M.; ALVES, M.P. PCR em tempo real. **Rev Biotec Ciência & Desenvolvimento**, n.33, p.10-13, 2004.

O'CONNELL, E.; BRENNAN, W.; CORMICAN, M. et al. *Chlamydia trachomatis* infection and sexual behavior among female students attending higher education in the Republic of Ireland. **BMC Public Health**, v.9, n.397, 2009.

OLIVEIRA, F.A.; PFLEGER, V.; LANG, K. et al. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.102, n.6, p.751-756, 2007.

OLIVEIRA, M.L.; AMORIM, M.M.R.; SOUZA, A.S.R.; ALBUQUERQUE, L.C.B.; COSTA, A.A.R. Chlamydia infection in patients with and without cervical intra-epithelial lesions tested by real-time PCR vs. direct immunofluorescence. **Braz J Infec Dis**, v.12, n.4, p.324-328, 2008a.

OLIVEIRA, P.M.; MASCARENHAS, R.E.; FERRER, S.R. et al. Vulvovaginites em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v.30, n.3, p.121-126, 2008b.

OLIVEIRA, L.H.S; FERREIRA, M.D.P.; AUGUSTO A.F. et al. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43,, n.1, p.4-8, 2010.

OLIVEIRA-SILVA, M.; LORDELLO, C.X.; ZARDO, L.M.G.; BONVICINO, C.R.; MOREIRA, M.A.M. Human papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. **Virologia J**, v.8, n.4, p.1-6, 2011.

PASCHOINI, M.C.; DUARTE, G.; CUNHA, S.P.; FONSECA, B.A.L. Avaliação da soroprevalência dos Vírus Herpes Simples tipos 1 e 2 em parturientes. **RBGO**, v.23, n.1, p.15-20, 2001.

PASSOS, M.R.L.; ALMEIDA, G.; GIRALDO, P.C. Papilomatose humana em genital, parte I. **DST – J bras Doenças Sex Transm**, v.20, n.2, p. 108-124, 2008.

PAULUS, C.; NITZSCHE, A.; NEVELS, M. Chromatinisation of herpesvirus genomes. **Rev Med Virol**, v.20, p.34-50, 2010.

PELLATI, D.; MYLONAKIS, I.; BERTOLONI, G. et al. Genital tract infection and infertility. **Eur J Obst Ginecol Reprod Bio**, v. 140, p. 3-11, 2008.

PENNA, G.O.; HAJJAR, L.A.; BRAZ, T.M. Gonorréia. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.33, n.5, p.451-464, 2000.

PIAZZETTA, R.C.P.S.; CARVALHO, N.S.C.; ANDRADE, R.P.; PIAZZETTA, G.; PIAZZETTA, S.R.; CARNEIRO, R.; Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do sul do Brasil. **RBGO**, v.33, n.11, p.328-333, 2011.

PINTO, A.P.; BAGGIO, H.C.C.; GUEDES, G.B. Sexually-transmitted viral disease in women: clinical and epidemiological aspects and advances in laboratory diagnosis. **Braz J Infec Dis**, v.9, n.3, p.241-250, 2005.

PONTES, I.M. Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos. São Carlos: UFSCar, 2002. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. **Universidade Federal de São Carlos, São Carlos**, 2002.

RÁCZ, M.L. Herpesvirus. In: TRABULSI, L.R.; ALTHERTHUM. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p.633-644, 2008.

RODRIGUES, J.J.S.; SILVA, R.C.; SIQUEIRA, M.M. Técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao diagnóstico. In: ROSSETTI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças infecciosas – Diagnóstico Molecular** - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 16-40, 2006.

ROSSETTI, M.L. Introdução ao Diagnóstico Molecular. In: ROSSETTI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças Infecciosas – Diagnóstico Molecular** - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 41-46, 2006.

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

SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; ASTOLFI FILHO, S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus, Brazil, by PCR. **The Braz J of Infec Dis**, V. 7, n. 2, p. 91-95, 2003.

SANTOS, F.C.; OLIVEIRA, S.A.; SETÚBLA, S. et al. Seroepidemiological study of herpes simplex vírus type 2 in patients with acquired immunodeficiency syndrome in the city of Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.101, n.3, p.315-319, 2006.

SANTOS, P.J.B. Frequência de infecção pelo vírus do Papiloma Humano (HPV) em lesões de carcinoma de células escamosas da boca e sua relação com o polimorfismo do códon 72 da p53 em pacientes atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia (FCECON), em Manaus, Amazonas. Manaus: UFAM, 2007. Tese (doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, 2007.

SCHIELKE, S.; FROSCHE, M.; KURZAI, O. Virulence determinants involved in differential host niche adaptation of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Med Microbiol Immunol**, v.199, p.185-196, 2010.

SCHWEBKER, J.R.; BURGESS, D. Trichomoniasis. **Clin Microbiol Rev**, v.17, n.4, p.794-803, 2004.

SEADI, C.M.F. *Chlamydia trachomatis*. In: ROSSETTI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. **Doenças infecciosas – Diagnóstico Molecular** - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 61-73, 2006.

SHAW, K.; COLEMAN, D.; O'SULLIVAN, M.; STEPHENS, N. Public health policies and management strategies for *Chlamydia trachomatis* infection. **Risk Management and Healthcare Policy**, v.4, p.57-65, 2011.

SHAFIR, S.C.; SORVILLO, F.J.; SMITH, L. Current issues and considerations regarding trichomoniasis and human immunodeficiency virus in african-americans. **Clin Microbiol Rev**, v.22, n.1, p.37-45, 2009.

SIEMER, J.; THEILE, O.; LARBI, Y. et al. *Chlamydia trachomatis* infections as a risk factor for infertility among women in Ghana, west Africa. **Am J Trop Med Hyg**, v.78, n.2, p.323-327, 2008.

SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. **Fundamentos de genética**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SOARES, C.P. Papilomavírus Humano (HPV) – um estudo de revisão. **Rev Cien Farm**, v.20, n.1, p.11-34, 1999.

SORVILLO, F.; SMITH, L.; KERNDT, P.; ASH, L. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. **Emerging Infections Disease**, v.7, n.6, p.927-932, 2001.

SOUZA, M.A.; PASSOS, A.M.; TREITINGER, A.; SPADA, C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.43, n.4, p.359-361, 2010.

SPANO, L.C.; FERREIRA, M.S.R.; ALMEIDA, M.S.; NASCIMENTO, J.P.; LEITE, J.P.G. HCMV gB genotypes in cervical secretion and placenta tissues in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Brazil J Microbiol**, v.38, p.424-429, 2007.

STEBEN, M.; DUARTE-FRANCO, E. Human papillomaviruses infection: epidemiology and pathophysiology. **Gynecologic Oncology**, v.107, S2-S5, 2007.

SUBAK-SHARPE, J.H.; DARGAN, D.J. HSV molecular biology: general aspects of herpes simplex virus molecular biology. **Virus Genes**, v.16, n.2, 239-251, 1998.

SUNKOTE, T.R.; HARDICK, A.; TOBIAN, A.A.R. et al. Evaluation of multiplex real-time PCR for detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, herpes simplex virus type 1 and 2 in the diagnosis of genital ulcer disease in the Rakai District, Uganda. **Sex Transm Infect**, v.85, n.2, p.97-101, 2009.

SUTTON, M.; STENBERG, M.; KOUMANS, E.H.; McQUILLAN, G.; BERMAN, S.; MARKOWITZ, L. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004. **CID**, v.45, p.1319-1326, 2007.

TÁBORA, N.; ZELAYA, A.; BAKKERS, J.; MELCHERS, W.J.G.; FERRERA, A. *Chlamydia trachomatis* and genital human papillomavirus infections in female university students in Honduras. **Am J Trop Med Hyg**, v.73, n.1, p.50-53, 2005.

TAKEHARA, K.; TODA, T.; NISHIMURA, T. et al. Human papillomavirus types 52 e 58 are prevalent at uterine cervical squamous lesions from Japanese women. **Pathol Res Inter**, Article ID 246936, p.1-7, 2011.

TERRA A.P.S.; SILVA-VERGARA, M.L.; GOMES, R.A.S.; PEREIRA, C.L.L.; SIMPSON, A.J.G.; CABALLERO, O.L. Monitoramento de pacientes com AIDS para o desenvolvimento de doenças por citomegalovírus (CMV) usando-se PCR multiplex. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.33, n.6, p.583-589, 2000.

TERMINI, L.; VILLA, L.L. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. **DST- J bras Doenças Sex Transm**, v.20, n.2, p.125-131, 2008.

TOBIASON, D.M.; SEIFERT, H.S. Genomic content of Neisseria Species. **J Bacteriol**, v.192, n.8, p.2160-2168, 2010.

UNEMO, M.; SETH-SMITH, H.; CUTCLIFFE, L.T. The Swedish new variant of *Chlamydia trachomatis*: genome sequence, morphology, cell tropism and phenotypic characterization. **Microbiology**, v.156, p.1394-1404, 2010.

VAN DER POL, B.; KRAFT, C.S.; WILLIAMS, J.A. Use of adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of Chlamydia and gonorrhoeae to detect *Trichomonas vaginalis* in Urogenitalm specimens. **J Clin Microbiol**, v.44, n.2, p.366-373, 2006.

VAN DER POL, B. *Trichomonas vaginalis* infection: the most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. **Clin Infec Dis**, v.44, p.23-5, 2007.

VAN DER POL, B.; KWOK, C.; PIERRE-LOUIS, B. et al. *Trichomonas vaginalis* infections and human immunodeficiency virus acquisition in African women. **JID**, v.197, p.548-554, 2008.

VIEIRA, S. **Bioestatística - Tópicos avançados**. 2 Ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

WATSON, J.D.; MYERS, R.M.; CAUDY, A.A.; WITKOWSKI, J.A. **DNA recombinante: genes e genomas**. 3ª Edição, 496p., Porto Alegre: Artmed, 2009.

WEINBERG, A.; CANTO, C.L.M.; PANNUTI, C.S. et al. Herpes simplex virus type 2 infection in pregnancy: asymptomatic viral excretion at delivery and seroepidemiologic survey of two socioeconomically distinct populations in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med trop São Paulo**, v.35, n.3, p.285-290, 1993.

WENDEL, K.A.; ERBELDING, E.J.; GAYDOS, C.A.; ROMPALO, A.M. *Trichomonas vaginalis* polymerase chain reaction compared with standard diagnostic and therapeutic protocols for detection and treatment of vaginal trichomoniasis. **CID**, v. 35, p. 576-580, 2002.

WHILEY, D.M.; BUDA, P.J.; BAYLISS, J.; COVER, L.; BATES, J.; SLOOTS, T.P. A new confirmatory Neisseria gonorrhoeae real-time PCR assay targeting the porA pseudo-gene. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.23, p. 705-710, 2004.

WHILEY, D.M.; TAPSALL, J.W.; SLOOTS, T.P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*. An ongoing challenge. **J Mol Diagnos**, v.8, p.3-15, 2006.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sexually Transmitted and other reproductive tract infectious. A guide to essencial practice**, 2005.

YAMAMOTO, A.Y.; AQUINO, V.H.; FIGUEIREDO, L.T.M; MUSSI-PINHATA, M.M. Diagnóstico de infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.31, n.1, p.19-26, 1998.

zur HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v.384, n.2, p. 260-265, 2009.

