

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA

**Ensaio de PCR multiplex para detecção de *Trichomonas vaginalis*,
Treponema pallidum E *Neisseria gonorrhoeae* em amostras vaginais auto
coletadas de mulheres ribeirinhas no município de COARI/AM**

MANAUS/AM

2020

CLEITON DE SOUZA MENDES

**Ensaio de PCR multiplex para detecção de *Trichomonas vaginalis*,
Treponema pallidum E *Neisseria gonorrhoeae* em amostras vaginais auto
coletadas de mulheres ribeirinhas no município de COARI/AM**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira (UFAM)

Coorientadora: Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha (UFAM)

MANAUS/AM

2020

Ficha Catalográfica

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

M538e Mendes, Cleiton de Souza
Ensaio de PCR multiplex para detecção de *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* E *Neisseria gonorrhoeae* em amostras vaginais auto coletadas de mulheres ribeirinhas no município de COARI/AM / Cleiton de Souza Mendes . 2020
111 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Cintia Mara Costa de Oliveira
Coorientadora: Danielle Albuquerque Pires Rocha
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Infecções sexualmente transmissíveis. 2. Diagnóstico molecular. 3. Coari. 4. Amazonas. 5. PCR multiplex. I. Oliveira, Cintia Mara Costa de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CLEITON DE SOUZA MENDES

**Ensaio de PCR multiplex para detecção de *Trichomonas vaginalis*,
Treponema pallidum E *Neisseria gonorrhoeae* em amostras vaginais auto
coletadas de mulheres ribeirinhas no município de COARI/AM**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 18 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Cintia Mara Costa de Oliveira, Presidente.
Universidade Federal do Amazonas, UFAM

Prof^a. Dr^a. Antonia Queiroz Lima de Souza, Membro
Universidade Federal do Amazonas, UFAM

Prof^a. Dr^a. Aya Sadahiro, Membro
Universidade Federal do Amazonas, UFAM

Dedico primeiramente a Deus, a minha
família e ao grupo GP autocoleta.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me manter com saúde e me consentir realizar essa etapa da minha vida.

A minha família que é a base da nossa vida. Agradeço ao meu pai Francisco Mendes Albuquerque e minha mãe Zenaide Prestes Ferreira, pelos incentivos durante toda a minha vida.

A minha orientadora Dra. Cíntia Mara, pelos valiosos ensinamentos, incentivo, amizade e dedicação.

A minha co-orientadora Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha, por me apoiar desde a minha graduação, orientações e contribuição para que esse trabalho fosse realizado.

A toda a equipe do grupo GP autocoleta, que se empenharam em realizar a autocoleta nas comunidades ribeirinhas e processamento laboratorial das amostras.

Ao apoio do MSc. Joaquim, pelo ensinamento e acompanhamento no desenho dos *primers*, que foram usados na reação do meu trabalho.

Aos amigos do bloco M da salinha de vidro, pelas conversas, risadas, desesperos e compartilhamento de conhecimentos.

Aos meus amigos Arq. Armandinho Duarte e Regilson Silva, pela amizade e parceria de morar juntos na mesma residência aqui na capital.

A banca examinadora deste trabalho e a todos os professores que contribuíram com seus conhecimentos durante todo o curso de Pós-graduação.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em proporcionar o curso do Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC)

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela bolsa de estudo durante o curso.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram, para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

RESUMO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) configuram-se como um importante problema de Saúde Pública, pois se não diagnosticadas e tratadas corretamente podem resultar em severas complicações, tais como câncer de colo de útero, gravidez ectópica, abortos espontâneos, infertilidade, parto prematuro, dentre outros. Estima-se que a cada dia no mundo todo, um milhão de pessoas são infectadas com algum tipo de IST e 357 milhões de pessoas a cada ano. Para a identificação dessas infecções os testes moleculares têm se mostrado uma boa alternativa, pois apresentam alta sensibilidade e especificidade em relação aos demais testes. Este estudo tem como finalidade desenvolver um ensaio de PCR *Multiplex* para pesquisar a presença de *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* e *Neisseria gonorrhoeae* em amostras cervico-vaginais obtidas por autocoleta de mulheres ribeirinhas do município de Coari, no Amazonas, e correlacionar os índices de prevalência com características sociodemográficas, clínicas e comportamentais. A autocoleta vaginal foi realizada com o auxílio da escova COARI®, da Kolplast®. A extração de DNA foi realizada com kit ReliaPrep™ (Promega®) e à amplificação DNA genômico humano com os *primers* PCO3/PCO4. Para a detecção dos três patógenos foi desenvolvido um sistema de PCR multiplex usando *primers* específicos para cada patógeno. Os dados epidemiológicos, clínicos e comportamentais de risco para essas infecções foram analisados no programa SPSS. Foram autocoletadas 420 amostras vaginais, em 78 comunidades da zona rural do município de Coari. Nossos resultados mostraram que a idade das mulheres amostradas variou de 18 a 70, sendo a maioria (85,3%) casadas ou vivendo em união estável. Os resultados moleculares apresentaram 100% de positividade para DNA genômico humano; a mPCR detectou a presença do DNA de *T. vaginalis* em 1,9% das mulheres amostradas. Essas, apresentavam média de idade de 27,7 (DP= 6,4) e baixo nível educacional. A presença de DNA de *T. pallidum* e *N. gonorrhoeae* não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas.

Palavras-chaves: Infecções sexualmente transmissíveis. Diagnóstico molecular. Coari. Amazonas. PCR multiplex.

ABSTRACT

Sexually Transmitted Infections (STIs) are an important public health problem, because if not properly diagnosed and treated, they can result in severe complications, such as cervical cancer, ectopic pregnancy, spontaneous abortions, infertility, premature birth, among others. It is estimated that every day worldwide, one million people are infected with some type of STI and 357 million people each year. For the identification of these infections, molecular tests have shown to be a good alternative, as they present high sensitivity and specificity in relation to other tests. This study aims to develop a *Multiplex* PCR assay to search for the presence of *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervico-vaginal samples obtained by self-collection from riverside women in the municipality of Coari in Amazonas and to correlate the prevalence rates with sociodemographic characteristics, clinical and behavioral. The vaginal self-collection was performed with the aid of the KARPLAST® COARI® brush. DNA extraction was performed with QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) and human genomic DNA amplification with PCO4 / GH20 primers. For the detection of the three pathogens, a multiplex PCR system was developed using specific primers for each pathogen. Epidemiological, clinical and behavioral data at risk for these infections were analyzed in the SPSS program. 420 vaginal samples were self-collected from 78 rural communities in the municipality of Coari. Our results showed that the age of the women sampled ranged from 18 to 70, with the majority (85.3%) being married or living in a stable relationship. The molecular results showed 100% positivity for human genomic DNA; mPCR detected the presence of *T. vaginalis* DNA in 1.9% of the women sampled. These had a mean age of 27.7 (SD = 6.4) and a low educational level. The presence of *T. pallidum* and *N. gonorrhoeae* DNA was not detected in any of the analyzed samples.

Keywords: Sexually transmitted infections; Molecular diagnosis; Coari; Amazonas; *Multiplex* PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Trofozoíto do <i>Trichomonas vaginalis</i>	20
Figura 2 - Ciclo biológico do <i>Trichomonas vaginalis</i>	21
Figura 3 - <i>Treponema pallidum</i>	29
Figura 4 - Genoma circular do <i>T. pallidum</i> Amoy	30
Figura 5 - Incidência da Sífilis no mundo.....	32
Figura 6 - Taxa de detecção de sífilis adquirida, sífilis em gestante e sífilis congênita (por 100.000 habitantes), no Brasil em 2018.....	33
Figura 7 - Sífilis primária – cancro duro	35
Figura 8 - Sífilis secundária – lesões palmares	36
Figura 9 - Diplococo Gram-negativo <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	40
Figura 10 - Corrimento uretral em paciente com gonorreia.....	41
Figura 11 - Representação esquemática da infecção causada por <i>N. Gonorrhoeae</i> ..	42
Figura 12 - Localização geográfica do Município de Coari no Amazonas	51
Figura 13 - Fluxograma 01 da primeira etapa de atividades do projeto	54
Figura 14 - Fluxograma 02. Segunda etapa de atividades do projeto	55
Figura 15 - Detalhamento do dispositivo usado na autocoleta	57
Figura 16 - Gel de agarose a 1,5%, corado cm brometo de etídeo	70
Figura 17 - Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos epidemiológicos sobre a prevalência de infecção pelo <i>T. vaginalis</i> em mulheres no Brasil	24
Quadro 2 - Estudos epidemiológicos sobre a prevalência de infecção pelo <i>T. pallidum</i> em mulheres no Brasil	34
Quadro 3 - Estudos epidemiológicos sobre a prevalência de infecção pela <i>N. gonorrhoeae</i> em mulheres no Brasil	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições da PCR do DNA genômico humano usando os primers PCO3 e PCO4.....	58
Tabela 2 - Primers utilizados na detecção de <i>T. vaginalis</i>	61
Tabela 3 - Primers utilizados na detecção de <i>N. gonorrhoeae</i>	61
Tabela 4 - Primers utilizados na detecção de <i>T. pallidum</i>	62
Tabela 5 - Reagentes, concentrações e volumes utilizados no sistema de reação da PCR multiplex	62
Tabela 6 - Condições de amplificação da reação de PCR multiplex.....	63
Tabela 7 - Descrição das comunidades ribeirinhas quanto a região, comunidades e quantidades de amostras	65
Tabela 8 - Descrição segundo a frequência das variáveis de idades, escolaridade, econômicas e ocupacional das mulheres participantes do estudo	66
Tabela 9 - Descrição segundo a frequência das variáveis do estado civil e Gestacionais das mulheres participantes do estudo	67
Tabela 10 - Descrição quanto a frequência do comportamento sexual das mulheres participantes do estudo	68
Tabela 11 - Descrição quanto a frequência de existência de casos de IST nas mulheres participantes do estudo.....	69
Tabela 12 - Descrição quanto as queixas clínicas das mulheres participantes do estudo.....	69
Tabela 13 - Associação das variáveis relativas as mulheres infectadas por <i>T. vaginais</i>	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS - Agente Comunitário de Saúde

AFT-ABS – Teste de anticorpos treponêmicos fluorescentes com absorção, do inglês *Fluorescent Treponemal Antibody Absorption Test*

ATP – Adenosina Trifosfato

CPS – Cisteína-proteinases

DGI – Infecção Gonocócica Disseminada, do inglês *disseminated gonococcal infection*

DIP – Doença Inflamatória Pélvica

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DNTPs – Adenina, Citosina, Guanina e Timina

DP – Desvio-padrão

DST – Doença Sexualmente Transmissível

FUAM – Fundação Alfredo da Matta

F – Frequência absoluta simples

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HSH – Homens que fazem Sexo com Homens

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgG – Anticorpo de Imunoglobulina G

IgM – Anticorpo de Imunoglobulina M

ISB – Instituto de Saúde e Biotecnologia

IST – Infecções Sexualmente Transmissíveis

KM – Quilômetro

LPG – Lipofosfoglicano

Mgb – Megabase

MEC – Matrix Extracelular

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mim – Minutos

mM – microlitros

mPCR – PCR multiplex

N. gonorrhoeae – *Neisseria gonorrhoeae*

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica, do inglês *National Center for Biotechnology Information*

N-PCR – PCR *nested*

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – Regiões de Leitura Aberta, do inglês *open reading frames*

pb – Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PCRSQ – PCR semi-quantitativo

pH - Potencial Hidrogeniônico

pmol – picomol

PPGBIOTEC – Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia

qPCR – PCR em tempo real

RT-PCR – PCR por transcriptase reversa

seg – Segundos

SINAN – Sistema Brasileiro de Informações de Doenças Notificáveis

SUS – Sistema Único de Saúde

T. pallidum – *Treponema pallidum*

T. vaginalis – *Trichomonas vaginalis*

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TEB – Tris borato e EDTA

TR – Testes Rápidos

UBS – Unidade Básica de Saúde

UBSF – Unidade básicas de Saúde Fluvial

UFAM – Universidade Federal do Amazonas

VDRL – Laboratório de Pesquisa de Doenças Venéreas, do inglês Venereal Disease Research Laboratory

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	16
Infecções Sexualmente Transmissíveis.....	16
Trichomonas vaginalis.....	19
Treponema pallidum.....	27
Neisseria gonorrhoeae	39
Métodos moleculares de diagnóstico	46
Ensaio de PCR <i>multiplex</i>	47
OBJETIVOS	50
Geral	50
Específicos	50
MATERIAL E MÉTODOS	51
Desenho do estudo e Local de coleta	51
Aspectos Éticos	51
População de Estudo.....	52
Critérios de inclusão/exclusão	52
Cálculo do <i>N</i> amostral	53
Coleta de amostras biológicas, de dados e procedimento de análises.....	53
Coleta de amostras biológicas e coleta de dados.....	56
Processamento laboratorial das amostras	57
Extração de DNA.....	58
Técnica de PCR para detecção de DNA Genômico Humano.....	58
Técnica de Eletroforese	58
Escolha de genes e desenho de iniciadores	59
Detecção molecular dos Patógenos	61

Construção de banco de dados e análise estatística	64
RESULTADOS	65
Caracterização geral da população em estudo	65
Resultados moleculares	70
Perfil das mulheres infectadas por <i>T. vaginalis</i>	71
DISCUSSÃO.....	75
Prevalência de infecção por <i>T. vaginalis</i>	78
Prevalência de infecção por <i>N. gonorrhoeae</i>	83
Prevalência de infecção por <i>T. pallidum</i>	85
CONCLUSÕES.....	88
Considerações finais:	88
REFERENCIAS.....	89
ANEXOS.....	105
Anexo 1 – Ficha de Identificação.....	105
Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	107
Anexo 3 - Folder ilustrativo da tecnica de autocoleta	109
Anexo 4 - protocolo RELIAPREP – Extração de DNA	110

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) são um grave problema de Saúde Pública, sobretudo devido à sua magnitude e dificuldade de acesso ao tratamento adequado para a maioria das populações, principalmente as que moram em países de baixa renda. A principal forma de transmissão é o contato sexual (oral, vaginal ou anal), sendo de fundamental importância o uso de preservativo (camisinha masculina ou feminina) para interromper a cadeia de transmissão. Em 2012 a incidência global foi estimada em 357,4 milhões de casos novos de IST curáveis no mundo, na faixa etária de 15 a 49 anos, a maioria deles em países em desenvolvimento (NEWMAN et al., 2015; PINTO et al., 2018).

As IST podem ser causadas por diversas espécies de bactérias, fungos, vírus e protozoários adquiridas principalmente pelo contato sexual. Tais infecções acarreta aumento de gastos com assistência à saúde, tanto de forma direta para o diagnóstico e tratamento, como para o manejo das diversas consequências oriundas dessas infecções tais como, mau desfecho gestacional, infecções perinatais, doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez ectópica, infertilidade masculina e feminina, cânceres, abortos, prematuridade, natimortos, mortalidade neonatal e infecções congênitas, além de aumentar o risco de transmissão do HIV. Estas infecções também podem interferir negativamente na vida social dessas pessoas, prejudicando o convívio de portadores com a sociedade e diminuindo sua força de trabalho (JUNIOR; SHIRATSU; PINTO, 2009; LUPPI et al., 2011; SHAKYA et al., 2018).

A detecção precoce e o tratamento adequado desses patógenos são de grande importância para diminuir as complicações a longo prazo. Neste contexto, métodos de detecção mais sensíveis e novas estratégias para coleta das amostras biológicas estão sendo analisados em alguns países. Dentre essas estratégias, a autocoleta através de escovas cérvico-vaginais tem sido uma das mais estudadas. Este método consiste na introdução de um dispositivo estéril (principalmente escova) no canal vaginal pela própria paciente em um ambiente privado (quarto, banheiro e outros), não havendo a necessidade de assistência

de um profissional de saúde e nem o deslocamento até uma unidade de saúde (ALMEIDA-LUGO et al., 2019; DARLIN et al., 2013).

A implementação de rastreamento através de autocoleta no Brasil poderia ser uma estratégia de sucesso em regiões como a Amazônia brasileira (Região Norte), pois esta é bastante extensa e há muitas comunidades isoladas e de difícil acesso, onde "rios são estradas". A maioria dessas comunidades não tem infraestrutura básica, nem mesmo eletricidade 24 horas por dia. Esse isolamento geográfico dificulta a assistência à saúde. Por isso, os testes não invasivos podem ser ferramentas importantes para a detecção de IST nessas regiões (ROCHA., 2019). As vantagens para uso nessas comunidades incluem o transporte mais fácil das amostras para o laboratório para processamento, custos mais baixos e a conveniência do método de coleta (ALMEIDA-LUGO et al., 2019).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente um milhão de IST são adquiridas por dia no mundo. Destas, estima-se que, por ano, 357 milhões sejam novos casos de IST tratáveis, como sífilis, infecção clamidiana, tricomoníase e gonorreia (NEWMAN et al 2015). No Brasil, a verdadeira situação epidemiológica dessas doenças e de suas complicações não são bem conhecidas, devido ao fato da maioria das IST não ser de notificação compulsória, além da escassez de estudos sentinelas e de base populacional (SILVA et al., 2018; Pinto et al., 2018). Em 2003 estimou-se a ocorrência de 1.967.200 novos casos de infecção por *Chlamydia trachomatis*, 1.541.800 novos casos de infecção por *Neisseria gonorrhoeae* e 937.000 novas infecções por *Trichomonas vaginalis* no Brasil. Essa elevada estimativa de IST em população torna fundamental a investigação da pertinência da implantação de estratégias de diagnóstico precoce (LUPPI et al., 2011).

No estado do Amazonas, tanto na capital quanto nos municípios do interior, encontramos poucos estudos epidemiológicos sobre as infecções causadas por patógenos sexualmente transmissíveis. Portanto, a verdadeira prevalência e incidência dessas infecções são desconhecidas. Diante desse contexto, este estudo visa estimar a prevalência de três patógenos sexualmente transmissíveis - *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* e *Neisseria gonorrhoeae* - em mulheres moradoras da zona rural do município de Coari no Amazonas, usando a técnica de PCR multiplex (mPCR).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Infecções Sexualmente Transmissíveis

Infecção Sexualmente Transmissível (IST), desde 2015, passou a ser a terminologia adotada pelo Ministério da Saúde em substituição à Doença Sexualmente Transmissível (DST), em consonância com recomendações globais. Tal mudança visa desmistificar a ideia de que todas IST necessariamente manifestam sintomas. Muitas delas podem ser assintomáticas e, portanto, alimentam a cadeia de transmissão da infecção. As IST estão entre as doenças mais disseminadas do mundo, particularmente em países de baixa renda. Essas infecções podem ser causadas por mais de 30 agentes etiológicos incluindo bactérias, vírus, fungos e protozoários. A transmissão ocorre principalmente por contato sexual, via sanguínea e vertical (da mãe para o filho durante a gestação, parto e amamentação). Quanto ao prognóstico, algumas apresentam tratamento e cura enquanto outras são passíveis apenas de acompanhamento para minimização dos sintomas. Ressalta-se que as infecções apresentam elevadas taxas de incidência e prevalência e manifestam maiores complicações entre as mulheres em idade reprodutiva (BRASIL, 2015; FERNANDES *et al.*, 2016). (NEWMAN *et al.*, 2013).

Os adolescentes e jovens possuem uma maior vulnerabilidade às IST, levando em consideração principalmente razões comportamentais. As mulheres possuem uma maior suscetibilidade para adquirir essas infecções, pois apresentam um colo uterino com o epitélio colunar estendido à sua superfície externa (ectopia) nos primeiros anos após a menarca (GEVELBER *et al.*, 1999). O ambiente vaginal em condições normais possui um pH ácido (3,8 a 4,5), predominando as bactérias *Lactobacillus sp.*, o que impede o crescimento de microrganismos patogênicos, pois produz e libera substâncias como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O pH vaginal pode ser modificado pelas alterações hormonais, principalmente, durante o ciclo menstrual e assim, facilita a infecção por esses agentes patogênicos (DONATI *et al.*, 2010; ESCHENBACH *et al.*, 2001).

Neisseria gonorrhoeae, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis*, vírus da hepatite B (HBV), papilomavirus humano (HPV)

e herpes simples vírus (HSV), assumiram grande importância para a saúde pública mundial, principalmente, por estarem relacionados a facilitação da aquisição e transmissão do HIV. Além disso, muitas vezes não apresentam sintomas, o que pode acarretar prejuízos mais graves para a saúde geral dos indivíduos infectados. Outras IST de menor importância, por apresentarem uma baixa prevalência, incluem a infecção por *Haemophilus ducreyi*, *Klebsiella granulomatis*, vírus T linfotrófico humano (HTLV), entre outras. Atualmente o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é o patógeno causador de IST de maior relevância para a saúde pública, causando grande impacto biológico e econômico por todo o mundo. A estimativa da infecção pelo vírus do HIV é de 70 milhões de pessoas ao longo dos anos, das quais mais de 35 milhões morreram (MELGAÇO et al., 2011; SILVA et al., 2018; MAYAUD; MCCARTNEY; MABEY, 2020).

Os patógenos mais comuns causadores de IST curáveis mundial são: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Treponema pallidum*, afetando principalmente mulheres com idade entre 25 a 49 anos. Segundo a OMS, em 2012, a estimativa de incidência mundial foi de 357 milhões de novos casos de IST curáveis, dos quais 131 milhões de casos de clamídia, 143 milhões de casos de tricomoníases, 80 milhões de casos de gonorreia e 6 milhões de casos de sífilis. Dentre esses, aproximadamente 126 milhões ocorreram na região das Américas (MAYAUD; MCCARTNEY; MABEY, 2020; ROGSTAD, 2019; WHO, 2012).

O perfil epidemiológico das IST estão relacionados a diversos fatores como: etnográficos, demográficos, socioeconômicos, comportamentais e de saúde. A incidência e apresentação clínica dessas doenças também são influenciadas por fatores como estilo de vida e suscetibilidade do indivíduo, patogenicidade e interação entre patógenos, terapia predominante e intervenções preventivas e de controle. Historicamente, a prevalência das infecções causadas por patógenos sexualmente transmissíveis pode ter diminuído com o advento da terapia antimicrobiana, destacando a descoberta da sulfonamida em 1936 e da penicilina em 1943. Porém, no início dos anos 60, os métodos anticoncepcionais orais tiveram um papel fundamental no aumento do número de casos dessas infecções, atingindo um pico de incidência maior (CHUGH, 2012; EDWARDS; APICELLA, 2004). Atualmente, o aumento da

prevalência das IST é observado no mundo, assim como o surgimento de resistência a antibióticos entre organismos causadores dessas infecções (KENT, 2017).

Existe diversas técnicas para o diagnóstico laboratorial dos diferentes patógenos causadores das IST como: a Cultura de células, Gram, exame de Microscopia, Imunofluorescência direta, exame a fresco, exame citológico, técnicas moleculares (como a reação em Cadeia da Polimerase – PCR), testes rápidos, dentre outras. A detecção desses microrganismos patogênicos através dos métodos moleculares são rápidos, altamente sensíveis e específicos para a detecção desses organismos em amostras clínicas. Estes métodos permitem o uso de espécimes como urina e swabs vaginais, que podem ser obtidos de pacientes sem desconforto (NG; MARTIN, 2005; RIETMEIJER, 2019).

As infecções por esses microrganismos podem ser tanto sintomáticas, quanto assintomáticas e quando aparecem sintomas geralmente eles são inespecíficos. Além disso, o estigma social associado a estas doenças dificulta a procura aos serviços médicos, o que diminui ou subestima substancialmente o número de novos casos (GERBASE, 1998). A alta eficiência da terapia antimicrobiana aos agentes causadores das IST fez com que esses patógenos perdessem a importância no conjunto das doenças infecciosas, que após a epidemia da Aids voltaram a representar problema de saúde pública. (SILVA et al., 2018).

O tratamento inadequado das IST ou o não tratamento pode resultar em complicações relacionadas a saúde reprodutiva da mulher como a doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez ectópica, infertilidade masculina e feminina, cânceres, abortos, prematuridade, natimortos, mortalidade neonatal e infecções congênitas, além de aumentar o risco de transmissão do HIV (JIMÉNEZ et al., 2001; PINTO et al., 2018).

As medidas de controle das IST são: sensibilização da população sobre a importância do uso de preservativos em relações sexuais, principalmente quando envolve múltiplos parceiros, diagnóstico precoce, tratamento adequado, além de programas de educação pública (MACHADO; SOUZA, 2015).

2.2. *Trichomonas vaginalis*

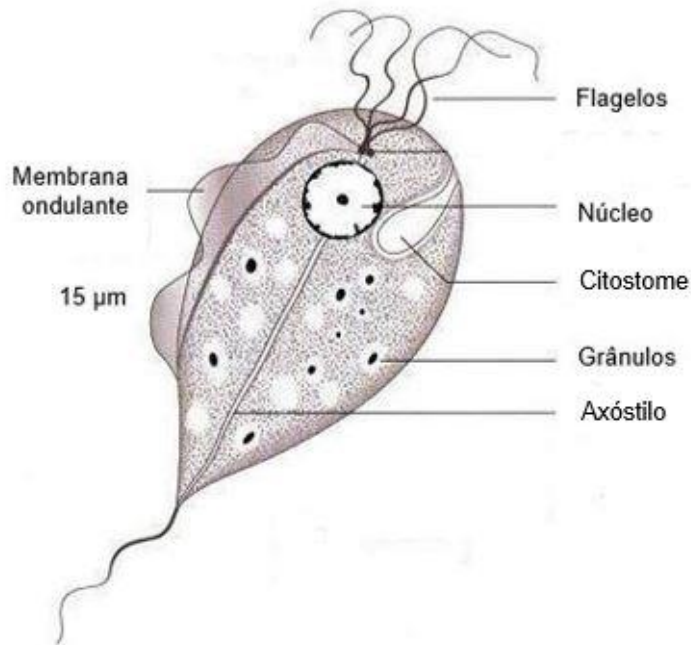
O parasita *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*) foi descrito pela primeira vez pelo pesquisador francês Alfred François Donné, em 1836, que isolou de secreção vaginal de uma mulher com vaginite. Mais tarde, Koelliker e Scanzoni, em 1885, isolaram o microrganismo de mulheres grávidas (PESSOA, 1942). Posteriormente, em 1894, Marchand e Miura (1894) e Dock (1896) observaram esse flagelado em uretrite masculina (DIAMANTIS; MAGIORKINIS; ANDROUTSOS, 2009; FEITTOSA; CONSOLARO, 2008).

A espécie *T. vaginalis* pertence ao domínio *Eukaryota*; Reino *Excavata*; filo *sarcomastigophora*; Classe *Parabasalia*; Ordem *Trichomonadida*; Família *Trichomonadidae*; Gênero *Trichomonas*. O *T. vaginalis* é uma célula tipicamente elipsóide, piriforme ou oval em preparações fixadas e coradas. As condições físico-químicas (pH, temperatura, tensão de oxigênio e força iônica) afetam o aspecto dos organismos, que não possuem a forma cística, somente a trofozoítica. Os trofozoítos são as formas mais jovens de flagelos livres enquanto a forma cística é caracterizada por flagelos interiorizados que conferem ao organismo o aspecto ameboide (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; YUSOF; KUMAR, 2012).

Morfologicamente o *T. vaginalis* possui quatro flagelos anteriores, desiguais em tamanho, um flagelo recorrente que se adere ao corpo pela costa (membrana ondulante) (Figura 1). O axóstilo é uma estrutura rígida e hialina, formada por microtúbulos, que se projeta através do centro do organismo, prolongando-se até a extremidade posterior. O núcleo é elipsóide, próximo à extremidade anterior. Esse protozoário é desprovido de mitocôndrias, mas apresenta grânulos densos que podem ser vistos ao microscópio óptico, os hidrogenossomos, que possuem uma enzima piruvato: ferredoxina oxidorreductase, capaz de transformar o piruvato em acetato pela oxidação fermentativa e liberar adenosina 5'-trifosfato (ATP) e hidrogênio molecular. Ele é capaz de manter o glicogênio em reserva como forma de energia, sendo importante para sobrevivência do parasito no ambiente vaginal que é constantemente modificado, principalmente por fatores hormonais, alterando o

pH local (BRAVO et al.,2010; CHEON et al, 2013; MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Figura 1 - Trofozoíto do *Trichomonas vaginalis*

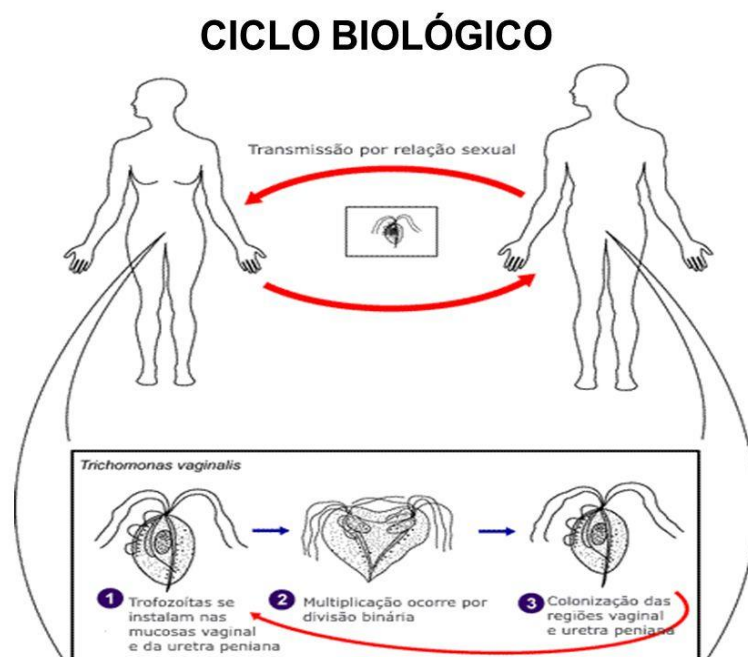


Fonte: <https://i1.wp.com/microbeonline.com/wp-content/uploads/2016/03/Trophozoite-of-Trichomonas.jpg>.

O *T. vaginalis* é um organismo anaeróbio facultativo. Varia em tamanho e forma, com o comprimento médio e largura de 9,5 µm (7,4 a 11,4). Cresce bem na ausência de oxigênio na faixa de pH compreendida entre 5,0 e 7,5 e em temperaturas entre 20°C e 40°C adequada para sua espécie. Como fonte de energia, o flagelado utiliza a glicose, maltose e galactose. Os carboidratos são a principal fonte de nutrientes para o *T. vaginalis*; no entanto, sob condições em que tais compostos são limitados, a utilização de aminoácidos torna-se vital. O parasita consome especialmente arginina, treonina e leucina (MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004; CHEON et al., 2013; SPEAR et al., 2014).

O genoma do *T. vaginalis* é constituído de aproximadamente 160 megabases (mbp) altamente repetitivo, que codifica até 60 mil proteínas em seis cromossomos haploides, com uma predição de 254 cópias de 18S rRNA e 251 cópias de 5.8S rRNA. A divisão do parasita acontece por divisão binária (processo no qual uma única célula eucarionte origina duas idênticas), como mostrada no ciclo biológica na Figura 2. (CARLTON et al., 2007; FIGUEROA-ÂNGULO, 2012; IBAÑEZ-ESCRIBANO et al., 2014; KAY et al., 2012).

Figura 2 - Ciclo biológico do *Trichomonas vaginalis*



Fonte: <http://slideplayer.com.br/slide/10820958/>

O *T. vaginalis* é um protozoário sexualmente transmissível, que através da adesão nas membranas da mucosa da uretra ou vagina causa a tricomoníase humana. O mecanismo de patogenicidade inicia com a aderência do *T. vaginalis* nas células do hospedeiro para estabelecer e manter a infecção. Após a citoaderência, o parasita torna-se ameboide, aumentando os contatos de superfície célula-célula e formando projeções citoplasmáticas que interdigitam as células-alvo. O processo envolve cinco proteínas adesinas de superfície do parasita (AP120, AP65, AP51, AP33 e AP23) que interagem com a superfície de células do hospedeiro, lipofosfoglicano (LPG) de proteínas de superfícies, proteínas no citoesqueleto (consistindo de microtúbulos e microfilamentos), receptores para proteínas da MEC (laminina, fibronectina e colágeno), transdução de sinais e auto-processos fagocitários. O ferro (disponível principalmente durante o período menstrual) e o contato celular regulam positivamente os níveis de aderência, aumentando diretamente a síntese de adesinas, por outro lado, também regulam negativamente a expressão de várias proteínas antigênicas, como a proteína P270. (CARLTON et al., 2007; MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004).

Este microrganismo tem como principal habitat o muco e secreção vaginal nas mulheres; nos homens, pode colonizar a uretra, próstata e epidídimo,

possuindo alto tropismo pelo epitélio escamoso genital (DAUGHERTY, GLYNN, BYLER, 2018; SCHWEBKER; BURGESS, 2004).

O homem é o hospedeiro natural do *T. vaginalis*, que tipicamente é transmitido por relações sexuais, mas também pode ser transmitido através de fômites, justificando a presença do patógeno em crianças e pessoas sem práticas sexuais, podendo ser transmitido ao recém-nascido durante a passagem por um canal de parto infectado. Esse protozoário infecta principalmente o epitélio escamoso genital. A infecção, uma vez estabelecida, persiste por longos períodos em mulheres, mas apenas por pouco tempo nos homens. É principalmente uma doença do sistema reprodutivo, e raramente as manifestações clínicas da infecção são observadas antes da menarca ou após a menopausa. O período de incubação é de 4 a 28 dias em cerca de 50% dos indivíduos infectados. De acordo com a gravidade da infecção, a tricomoníase pode ser classificada como aguda, crônica ou assintomática (Figura 2) (MADICO et al., 1998; PETRIN et al., 1998).

O estabelecimento do *T. vaginalis* na vagina se inicia com o aumento do pH, já que o pH normal da vagina é ácido (3,8 e 4,5) e o organismo cresce em pH maior que 5. A relação entre *Lactobacilos sp* protetores e *T. vaginalis* não é completamente compreendida. Claramente, o *T. vaginalis* desenvolveu vários mecanismos para sobreviver no microambiente vaginal em constante mudança. Durante a menstruação, o ambiente sofre uma drástica mudança com o influxo de eritrócitos, macromoléculas hospedeiras, e constituintes séricos, bem como grandes mudanças no pH. É notável que não só o parasita sobreviva a estas mudanças ambientais, mas também que a infecção persista. O fluxo menstrual fornece nutrientes para o parasita, bem como um suprimento de ferro, que é um fator-chave na regulação gênica do *T. vaginalis* e regula várias adesinas, imunogênicos e proteinases degradadoras de C3 que aumenta a capacidade do parasita para lidar com tensões em um ambiente hostil (ARROYO; ALDERETE, 1989; PETRIN et al., 1998).

O *T. vaginalis* possui vários mecanismos para regular a expressão de fatores de virulência, particularmente Cisteína-proteinases (CPs), adesinas entre outros. Sua regulamentação pode ser observada em quatro níveis diferentes: transcricional, pós-transcricional, regulação traducional e pós-traducional (FRIGUEROA-ANGULO et al., 2012). As interações de *T. vaginalis* com a

microbiota vaginal são complexas e enfatizam o impacto que a infecção por *T. vaginalis* tem, e que vai muito além da tricomoníase severa e sintomática (KUSDIAN; GOULD, 2014).

O *T. vaginalis* tem uma agressiva resposta celular local, que resulta na inflamação do epitélio vaginal com pontos hemorrágicos na mulher e inflamação na uretra do homem. Em pessoas HIV positivas, a hemorragia e a inflamação podem aumentar o nível de vírus nos fluídos corporais, com linfócitos e macrófagos presentes na área genital de contato. Em pessoas HIV negativas, a infiltração leucocitária e as lesões genitais induzidas por esse protozário pode ampliar a porta de entrada para o HIV, isso acontece pelo aumento do número de células alvo para o vírus e pelo acesso direto do vírus a corrente sanguínea, através de lesões abertas (SORVILLO et al., 2001).

Como anteriormente mencionado, a infecção por *T. vaginalis* é um das IST não viral mais prevalente em todo o mundo (NOH et al., 2019; BRUNI et al 2019;). No entanto, nossa compreensão da epidemiologia da infecção por *T. vaginalis* contém algumas lacunas, uma vez que essa infecção muitas vezes não é testada em grandes estudos de base populacional e a doença que não é normalmente monitorada por órgãos de saúde pública (VAN DER POL, 2016). As estimativas globais mais recentes das IST curáveis relataram 143 milhões de novos casos de tricomoníase por ano entre mulheres e homens com idades entre 15 a 49 anos, a prevalência geral foi de 5,0% e 0,6%, respectivamente (NEWMAN et al., 2015).

A prevalência e incidência da infecção vaginal por *T. vaginalis* são maiores nas regiões africanas e nas Américas que em outras partes do mundo. Na Africa estima-se que a incidência chega a 28,1 milhões em mulheres e 31,6 milhões em homens, a prevalência nessa região é estimada em 38,9 milhões em mulheres e em homens 3,9 milhões. Nas Américas, a estimativa de incidência é de 42,5 milhões em mulheres e 43 milhões em homens; a prevalência em mulheres chegam a 52,7 milhões e em homens 5,2 milhões (BOUCHEMAL; BORIES; LOISEAU, 2017).

No Brasil, a prevalência da tricomoníase varia entre 1,9% e 37,5%, dependendo das técnicas utilizadas no diagnóstico, bem como da população estudada, idade, escolaridade, higiene pessoal e o acesso a saneamento que, juntos são fatores que podem explicar a existência de diferentes taxas de

positividade (AMBROZIO et al., 2016; BRAVO et al., 2010). O quadro 1 elenca as prevalências encontradas em alguns estudos epidemiológicos realizados em mulheres no Brasil, fornecendo elementos essenciais para a avaliação da magnitude dessa etiologia.

Quadro 1 - Estudos epidemiológicos sobre a prevalência de infecção pelo T. vaginalis em mulheres no Brasil

Local	População	Métodos de diagnóstico	Prevalência (%)	Autor
Pelotas/RS	Mulheres atendidas no Departamento de Saúde Materno-Infantil da Faculdade de Medicina da UFPel	Cultura	6,4	BRUNI et al., 2019
Rio Grande/RS	Estudo de base populacional	PCR	4,1	GATTI et al., 2017
Manaus/AM	Mulheres recrutadas em UBS e no hospital FCECON-AM	PCR	18,4	COSTA-LIRA et al., 2017
Coari/Am	Mulheres em exame ginecológico de rotina em UBS	PCR	12,7	ROCHA et al., 2014
Manaus/AM	Mulheres HIV positivas	Cultura	4,1	SILVA et al., 2013
Vitória Santo Antão/Pernambuco	Mulheres atendidas em UBS	Citologia	10,5	LIMA et al., 2013
Botucatu/SP	MPS	Cultura	3,0	POGETTO., 2011
São Paulo/SP	Mulheres atendidas em UBS	PCR	3,2	LUPPI et al., 2011
Vitória/ES	Atendidas em UBS	Cultura	2,0	BARCELOS et al., 2008
Pacoti/CE	Estudo de base populacional	Exame a fresco e citologia	4,1	OLIVEIRA et al., 2007

Fortaleza, Aracati/Ceará	Gestantes	Exame direto a fresco	6,2 (Fortaleza) e 4,4 (Aracati)	MARTINS et al., 2004
Rio de Janeiro/RJ	Gestantes	Exame citológico a fresco e técnica de Papanicolaou	3,7 e 2,7	SILVA FILHO, 2004
Manacapuru/ Am	MPS	Exame a fresco	39,5	BENZAKEN et al., 2002

Nota: **PCR** (Reação em Cadeia da Polimerase), **MPS** (Mulheres Profissionais do Sexo), **UBS** (Unidade básica de Saúde), **FCECON-AM** (Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas).

O Estado do Amazonas apresenta uma taxa de infecção por tricomoníase semelhante ao encontrado em outros estados brasileiro. A prevalência da infecção causada por esse parasita em mulheres gestantes no Amazonas é estimada em 5,6% que se assemelham a prevalência encontrada por estudos epidemiológicos realizados no Rio de Janeiro (3,7%) e Ceará (6,2%) (GATTI, 2017).

No Brasil, pelo fato de muitos médicos ainda acreditarem que a infecção por tricomoníase não causa grandes sequelas graves, a notificação de infecção por tricomoníase não é considerada compulsória, como ocorre em muitos outros países, muitos profissionais e pacientes consideram esta infecção mais como um incômodo ao invés de uma ameaça à saúde pública. Isso resulta em uma série de dificuldade para o controle da doença, como por exemplo, a escassez de métodos moleculares em estudos de detecção e prevalência de tricomoníases (COSTA-LIRA et al., 2017). Além disso, o progressivo abandono do uso do preservativo relacionado ao desconforto e ao esquecimento do risco de HIV, bem como o aumento da pobreza e baixo nível de educação podem explicar parcialmente o aumento no número anual de casos de tricomoníase urogenital no Brasil (BOUCHEMAL; BORRIES; LOISEUA, 2017). É importante salientar que esse patógeno possui vários fatores de riscos associados com a infecção por ele acometida, dos quais destacam-se, sexo desprotegido, múltiplos parceiros sexuais, gravidas soropositivas, baixa renda familiar, uso de álcool e drogas entre outros (GATTI et al., 2017; MIRANDA; PINTO; GAYDOS, 2014).

A tricomoníase é uma infecção sexualmente comum, que acomete ambos os sexos, sendo mais comum em adultos jovens sexualmente ativos. Pode apresentar-se de forma assintomática, sintomática leve e aguda, sendo variáveis seus sintomas. A infecção por *T. vaginalis* pode levar a sérias complicações em ambos os sexos, quando não diagnosticada e tratada adequadamente (MACHADO, SOUZA, 2015). O ponto mais importante em relação a esse patógeno é sua associação com o HIV, doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade, parto prematuro, recém-nascido com baixo peso e câncer do colo do útero (MACHADO; SOUZA, 2015; COSTA-LIRA et al., 2017).

Os principais mecanismos pelos quais a infecção pelo *T. vaginalis* expõe o indivíduo ao risco de adquirir o HIV são: estimulação da resposta inflamatória nos epitélios vaginais, exocervicais e uretrais; descontinuação da barreira epitelial; recrutamento de células alvo do HIV, tais como linfócitos TCD4 + e macrófagos; e produção de micro hemorragias (BRUNI, 2019; SORVILLO, et al., 2001; MACIEL; TASCA; DE CARLI, 2004;).

Os locais mais comuns dessa infecção nas mulheres são: na vulva, na vagina ou na uretra, podendo ser assintomáticas ou apresentar-se com sintomas como espuma claro, amarelo ou verde, corrimento vaginal purulento, fino, fétido, disúria, dispareunia, sangramento pós-coito e prurido vulvar. Homens infectados com tricomoníase podem ser assintomáticos ou apresentar disúria ou secreção mucopurulenta clara. Complicações de tricomoníase em homens pode incluir epididimite, prostatite, infertilidade e câncer de próstata (MARKLE; CONTI; KAD, 2013). Das mulheres infectadas, entre 25% e 50% são assintomáticas e ao exame clínico, pode ser observado erosão e pontos hemorrágicos na parede cervical conhecido como aspectos de morango (VAN DER POL, 2016).

O diagnóstico laboratorial da tricomoníase é essencial, não podendo ser baseada somente na apresentação clínica, pois a infecção poderia ser confundida com outras IST. As técnicas de diagnóstico compreendem exame direto a fresco, cultura de células, preparação corada, imunodiagnóstico e as técnicas moleculares (PCR, PCR em tempo real, mPCR). O método de cultura é o padrão-ouro, é simples de interpretar e apresenta alta sensibilidade, mas não tem utilidade clínica devido a um tempo de resposta estendido de até 5 dias. Portanto, a necessidade de um diagnóstico rápido, preciso e específico se faz necessário devido a fatores de riscos associados com a infecção (MACIEL;

TASCA; DE CARLI, 2004; BROWN et al., 2004; DE LEMOS, GRACÍA-ZAPATA, 2014.

Os testes de amplificação de ácido nucleico (TAAN) oferecem uma maior sensibilidade e especificidade para a identificação de *T. vaginalis* em relação aos demais métodos, inclusive da cultura de células. Embora atualmente não estejam amplamente disponíveis, eles provavelmente desempenharão um papel central no diagnóstico de *T. vaginalis* no futuro, pois permite a identificação em indivíduos sintomáticos ou assintomáticos (RAFFE; SONI, 2018).

O uso de preservativos continua sendo a melhor e mais confiável proteção contra IST. Contudo, devido a razões econômicas, o acesso ao uso de preservativos pode ser limitado, particularmente em países em desenvolvimento. O tratamento é específico e eficiente, sendo recomendado o tratamento simultâneo de parceiros sexuais para evitar a reinfecção. Atualmente, os fármacos 5-nitroimidazólicos são comumente usados no tratamento da tricomoníase por via oral e parenteral. No entanto, a administração sistêmica de quimioterápicos para prevenir a infecção resulta em aumento da incidência de cepas refratárias ao nitroimidazol. Para prevenir cepas resistentes são necessários métodos que utilizem formulações intravaginais locais ou vacinas (BOUCHEMAL; BORIES; LOISEAU, 2017).

O metronidazol é a droga mais eficaz no tratamento desta infecção. O tratamento recomendado para a tricomoníase é metronidazol, 2 gramas (g) por via oral em uma dose única ou tinidazol, 2 g por via oral em dose única. Os pacientes não devem beber álcool 24 horas após o término do tratamento com metronidazol e 72 horas após completar o tratamento com tinidazol (FAKHRIEH-KASHAN et al., 2018; MARKLE; CONTI; KAD, 2013).

A disponibilidade de apenas uma única classe de medicamentos para tratar a infecção é uma grande preocupação para a saúde pública, com o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos, especialmente devido à maior transmissão de HIV e HPV em indivíduos infectados (MARTINS et al., 2004).

2.3. Treponema pallidum

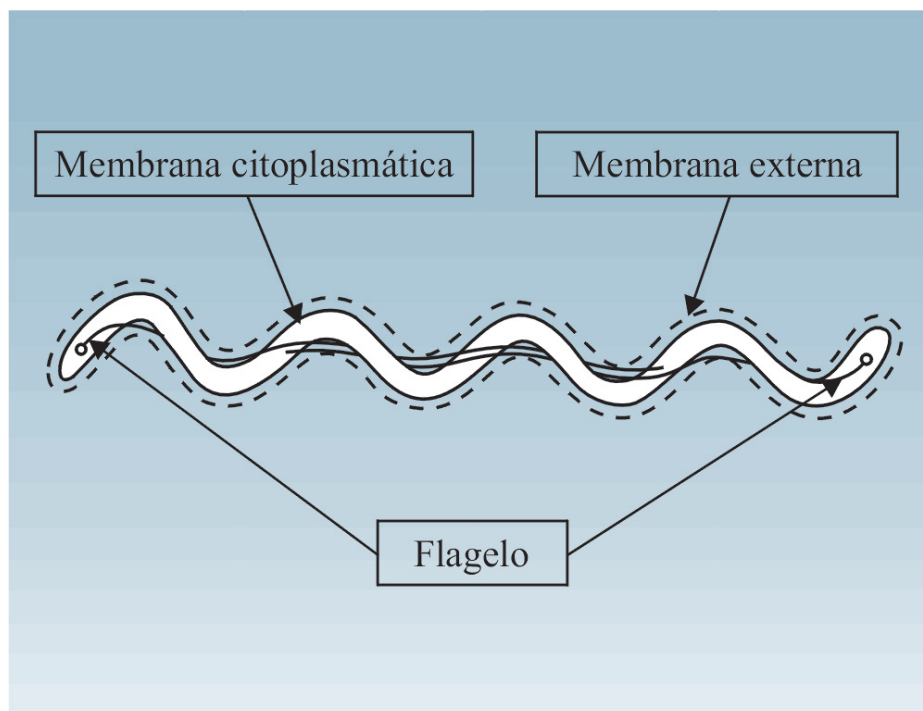
A bactéria *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) foi descoberta há mais de um século atrás em Berlim no ano de 1905, por Fritz Richard Schaudinm e Paul Erich Hoffman (microbiologistas alemães), que através de coloração de Giemsa demonstraram espiroquetas em fluido de lesão secundária (KOHL; WINZER, 2005; SOUZA, 2005).

O agente etiológico da sífilis é uma bactéria, do Reino Monera, Filo *Spirochaetes*; Classe *Spirochaetes*; gênero *Treponema*; da ordem *Spirochaetales*; da família *Spirochaetaceae*; chamada *T. pallidum* subespécie *pallidum*. Outros membros do gênero *Treponema* também podem infectar humanos: como o *T. pallidum* subespécie *pertene*, causador da boubá; o *T. pallidum* subespécie *endemicum*, causador do bejel e o *T. carateum*, causador da pinta. Entre todos, o *T. pallidum*, causador da sífilis é a espécie mais patogênica ao homem. A família *Spirochaetaceae* inclui ainda dois outros gêneros de importância clínica na saúde humana, os gêneros *Leptospira* e *Borrelia*, responsáveis pela leptospirose e doença de Lyme (LASAGABASTER; GUERRA, 2019; SUSO, et al., 2018).

A sífilis é uma infecção bacteriana crônica causada por *T. pallidum*, subespécie *pallidum*, bactéria de crescimento lento que não pode ser cultivada por fins clínicos (HOOK, 2017; KARP et al., 2009). O *T. pallidum* é geralmente transmitido sexualmente (oral, vaginal ou anal) através de microabrasões nas membranas da mucosa ou na pele, esse parasita entra rapidamente na corrente sanguínea para se disseminar para outros tecidos, podendo também ocorrer à transmissão vertical, que pode acontecer nos primeiros quatro anos após a infecção por esse patógeno (LASAGABASTER; GUERRA, 2019; HO; LUKEHART, 2011).

Morfologicamente o *T. pallidum* tem forma de espiral (10 a 20 voltas), com cerca de 6 a 20 µm de comprimento e apenas 0,1 a 0,2mm de espessura. O *T. pallidum* é uma bactéria com membrana citoplasmática trilaminar, uma camada de peptidoglicanos que dá rigidez estrutural e uma membrana externa com abundante lipídios e proteínas transmembranares escassas (Figura 3). Apresenta flagelos que se iniciam na extremidade distal da bactéria e encontram-se junto à camada externa ao longo do eixo longitudinal, contribuindo para que a bactéria se movimente em forma de espiral, vindo daí a denominação de espiroqueta (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006; SUSO et al., 2018).

Figura 3 - *Treponema pallidum*.



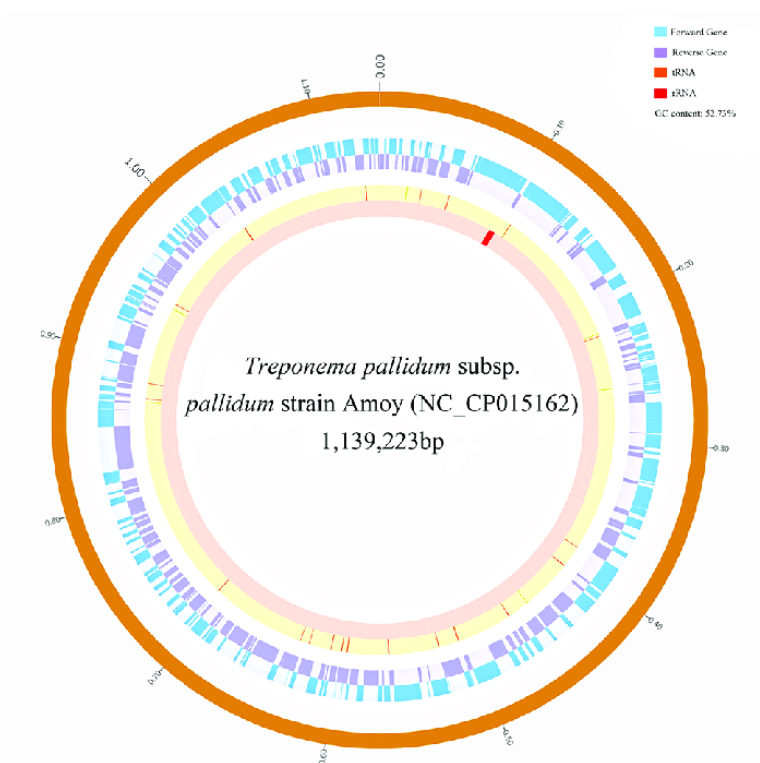
Fonte: AVELLEIRA; BOTTINO, (2006)

O genoma do *T. pallidum* subespécie *pallidum* (Nichols) foi sequenciado em 1998. Essa bactéria apresenta um cromossoma circular de 1.138.006 pares de bases (pb) com 1.041 regiões de leitura aberta (ORF - *open reading frames*) que representa 92,9% do DNA genômico total, contendo 52,8% de CG, 978 proteínas e 1.0130 genes. Os fatores de virulência ainda não são bem conhecidos. Algumas proteínas da membrana e várias hemolisinas têm sido associadas como potenciais fatores de virulência desse agente (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006; FRASER et al., 1998). Nas últimas décadas, vários genomas treponêmicos foram completamente sequenciados, incluindo TPA (Nichols), TPA SS14, TPA Chicago, TPE Samoa D, TPE CDC-2, TPE Gauthier, *T. paraluisuniculi cuniculi* A e o Amoy (Figura 4) (PĚTROŠOVÁ, et al., 2012; TONG et al., 2017).

O genoma do *T. pallidum* possui uma família multigênica, onde 12 genes são designados pelas letras A à L e um gene “*tpr*” que possui 60 pares de bases repetidas de sua sequência (HO, LUKEHART, 2011; LAFOND, LUKERHART; 2006). A partir dessa descoberta o desenvolvimento de técnica de diferenciação de subtipos foi possível, assim o número de sequências repetidas do gene *tpr* seguidos de uma letra é possível a definição do genótipo, possibilitando a

avaliação de distribuição geográfica desses subtipos pelo mundo, prevalecendo os subtipos: 14d, seguido de 14f, 14a, 13d, 15d (MA; GIACANI; LARA, 2015; PENG et al., 2011).

Figura 4 - Genoma circular do *T. pallidum* Amoy



Fonte: TONG et al., 2017.

Para estabelecer a infecção, o *T. pallidum* adere às células epiteliais e aos componentes da matrix extracelular da pele e da mucosa. Diversas proteínas desse parasita medeiam a aderência, que incluem a TP0136, TP0155 e a TP0483 (DJOKIC; GIACANI; PARVEEN, 2019; HO; LUKEHART, 2011; KE et al., 2015).

A penetração do treponema é realizada por pequenas abrasões decorrentes do contato sexual. Logo após, o treponema atinge o sistema linfático regional e, por disseminação hematogênica, outras partes do corpo. A resposta da defesa local resulta em erosão e ulceração no ponto de inoculação, enquanto a disseminação sistêmica resulta na produção de complexos imunes circulantes que podem depositar-se em qualquer órgão. Entretanto, a imunidade humoral não tem capacidade de proteção. A imunidade celular é mais tardia, permitindo

ao *T. pallidum* multiplicar e sobreviver por longos períodos (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006; HO; LUKEHART, 2011).

A sífilis apesar de ter sido descoberta há mais de um século atrás, continua sendo um problema de saúde pública em todo mundo. Distribuição da sífilis difere entre países de baixa e alta renda (KOJIMA, KLAUSNER, 2018). A OMS, estima que acontece aproximadamente 11 milhões de casos novos anualmente no mundo, as regiões mais afetadas são: América Latina, China e o Sudeste Asiático (SUSO et al., 2018). Em 2008, o Continente Americano apresentou uma prevalência de 1,5% em homens e 1,3% em mulheres, totalizando 6,7 milhões de casos no continente (WHO, 2012).

A crescente taxa de infecção nas Américas deve-se principalmente ao Brasil, que contribuiu com 85% dos casos de todos os casos registrados na região em 2015. Em 2010 e 2015 o número de casos dobrou. A prevalência global de sífilis neste país foi de aproximadamente 0,85% e a incidência de sífilis congênita de 4,70 por 1.000 nascidos vivos, a maior taxa na América Latina (PAHO, 2017).

Segundo a OMS em 2012, haviam 5,6 milhões de casos novos de Sífilis. A incidência global entre homens (17,7%) e mulheres (17,2%) foi semelhante, respectivamente, por outro lado, quando analisado por regiões essa incidência é diferente, na África havia uma incidência de 43,1% em mulheres e 22,5% em homens, na América os homens representavam 34,2% e as mulheres 17,7%, na Europa os homens 10,1% e as mulheres 6,6% e uma discrepância maior acontece no Oeste Pacífico onde os homens representaram 54,6% e as mulheres 81% (LASAGABASTER; GUERRA, 2019). A figura 5 mostra a estimativa da incidência de sífilis em diferentes regiões no mundo, em 2012.

Figura 5 – Incidência da Sífilis no mundo



Fonte: PEELING et al., 2017

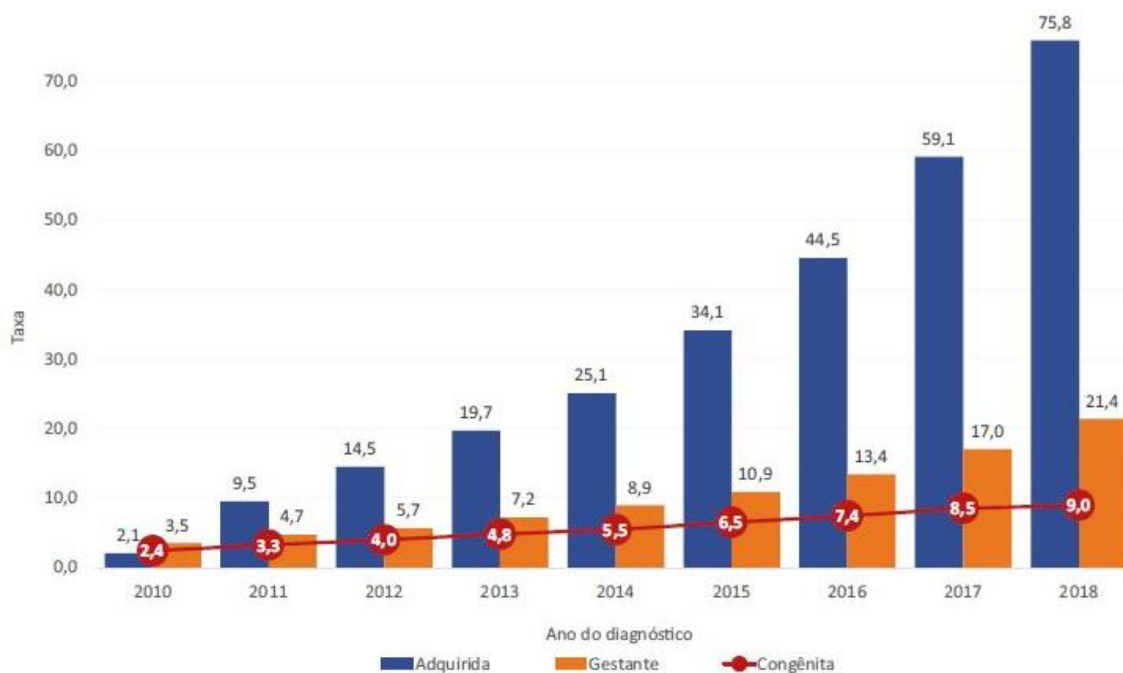
Em 2016, os Estados Unidos (EUA) apresentavam uma taxa de sífilis primária e secundária mais elevadas entre os homens (15,6 casos por 100.000 homens) do que nas mulheres (1,9 casos por 100.000 mulheres). Entre os 27.814 casos notificados de sífilis secundária nos EUA em 2016, 16.155 (58,1%) casos ocorreram entre homens que fazem sexo com homens (HSH). A percentagem de coinfeccção por HIV foi de 47,0% para HSH, 10,7% para homens que fazem sexo com mulheres e 4,1% para mulheres (KOJIMA; KLAUSNER, 2018). Nesse mesmo ano no Brasil, o Sistema Brasileiro de Informações de Doenças Notificáveis (SINAN), relatou 37.436 casos de sífilis materna e 20.474 de sífilis congênita. (VARGAS, et al., 2018). Entre 2010 e 2016, a taxa de detecção em gestantes aumentou de 3,7 para 12,4 casos por 1.000 nascimentos, levando a um aumento progressivo da taxa de sífilis congênita de 2,4 para 6,8 casos por mil nascidos vivos (BRASIL, 2017).

Segundo o boletim epidemiológico de Sífilis no Brasil 2018, em 2017 foram notificados pelo SINAN, 119.800 casos de Sífilis adquirida (taxa de detecção de 58,1 casos/100 mil habitantes); 49.013 casos de Sífilis em gestantes (taxa de detecção de 17,2/1.000 nascidos vivos); 24.666 casos de Sífilis congênita (taxa de incidência de 8,6/1.000 nascidos vivos); e 206 óbitos por sífilis congênita (taxa de mortalidade de 7,2/100 nascidos vivos). O estado do

Amazonas no mesmo ano, foram notificados 1.696 (1,4%) casos de sífilis adquirida, 1.573 (3,2%) casos de sífilis em gestantes, 802 (3,3%) casos de sífilis congênita e 3 (1,5%) óbitos por sífilis congênita (BRASIL, 2018).

Em 2018, o SINAN notificou 158.051 casos de sífilis adquirida (taxa de detecção de 75,8 casos/100.00 habitantes); 62.599 casos de sífilis em gestantes (taxa de detecção de 21,4/1.000 nascidos vivos); 26.219 casos de sífilis congêntas (taxas de de incidências de 9,0/1.000 nascidos vivos); e 241 óbitos por sífilis congênita (taxa de mortalidade de 8,2/100.000 nascidos vivos). No Amazonas, foram notificados 3.325 (2,1%) de sífilis adquirida, 1.588 (2,5%) de sífilis em gestantes, 775 (3,0%) de sífilis congênita e 7 (2,9%) óbitos por sífilis congênita (BRASIL, 2019). O gráfico mostrado na figura 6, detalha o crescimento da sífilis adquirida, sífilis em gestante e sífilis congênita, a partir do ano de 2010, no Brasil.

Figura 6 - Taxa de detecção de sífilis adquirida, sífilis em gestante e sífilis congênita (por 100.000 habitantes), no Brasil em 2018



Fonte: (Brasil, 2019)

No estado do Amazonas, assim como nos demais estados, estudos são escassos sobre a prevalência de infecções causadas pelo *T. pallidum*. Há uma grande deficiência de estudos epidemiológicos relativos a prevalência desse patógeno na cidade de Manaus (Capital) e também nas cidades do interior. O quadro 2 a seguir, elenca alguns estudos epidemiológicos realizados em

mulheres no Brasil. fornecendo elementos essenciais para a avaliação da magnitude dessa etiologia.

Quadro 2 - Estudos epidemiológicos sobre a prevalência de infecção pelo *T. pallidum* em mulheres no Brasil

Local	População	Métodos de diagnóstico	Prevalência (%)	Autor
Ouro Preto/MG	Estudo de base populacional	Testes rápidos	3,8	BARBOSA et al., 2019
Sul do Brasil	Estudo de base populacional	VDRL	3,8	PADOVANI; OLIVEIRA; PELLOSO, 2018
Rio de Janeiro/RJ	Gestantes	VDRL	4,1 (2012), 3,1 (2013) e 5 (2014)	CERQUEIRA et al., 2017
Londrina/PR	Estudo de Base Populacional	VDRL	6,3	GOMES et al., 2017
Pará/PA	Gestantes	VDRL	0,7	CASAL et al., 2011
Botucatu/SP	MPS	VDRL	4,8	POJETTO et al., 2011
Salvador/BA	Mulheres HIV-positivas	qPCR	9,5	TRAVASSOS et al., 2016
Pacoti/CE	Gestantes	RPR	0,2	OLIVEIRA et al., 2007
Fortaleza e Aracati/Ceará	Gestantes	RPR	2,1 (Fortaleza) e 0,3 (Aracati)	MARTINS et al., 2004
Manacapuru/Am	(MPS)	VDRL	39,5	BENZAKEN et al., 2002

Nota: **qPCR** (PCR em tempo real), **VDRL** (Venereal Disease Research Laboratory), **RPR** (rapid plasma reagin), **MPS** (Mulheres Profissionais do Sexo).

A enfermidade da sífilis se manifesta em estágios diferentes: Sífilis primária, Secundária, Latente e terciária. A Sífilis primária caracteriza-se por uma lesão ulcerativa indolor, geralmente solitária, endurecida e limpa, que normalmente aparece cerca de 2 a 3 semanas após o contato direto com a lesão infecciosa de outra pessoa. Embora os cancros sejam mais frequentemente vistos em homens no pênis distal (Figura 7), eles podem estar localizados em

outras partes do corpo (pênis, vulva, vagina, colo uterino, ânus, boca e outros locais de tegumento) onde o contato direto com outra lesão da pessoa infectada pode ocorrer e, embora por vezes despercebida, são bem descritos na vagina e colo do útero, dentro e perto do reto, e na boca, bem como em outra parte do corpo potencialmente exposto como dedos ou pescoço. O cancro duro regride espontaneamente entre 4 e 5 semanas, sem deixar cicatriz (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006; MERTIZ et al., 1998; SUSO et al., 2018).

Figura 7 - Sífilis primária – cancro duro



Fonte: AVELLEIRA; BOTTINO, 2006

A sífilis secundária caracteriza-se pela disseminação sistêmica da bactéria, quando não tratada, que após um período de latência que pode durar de 6 a 8 semanas, a doença entrará novamente em atividade. A erupção do segundo estágio pode ser generalizada ou localizada; pustular, maculopapular dissimulado ou na aparência escamosa; e pode imitar outros processos dermatológicos, incluindo pitiríase rósea, psoríase, erupções medicamentosas (Figura 8). Sintomas como mal-estar, mialgia, dor de garganta, dor de cabeça ou febre de baixo grau são comumente detectados. Além das manifestações cutâneas, a apresentação da sífilis secundária também pode incluir linfadenopatia difusa, hepatoesplenomegalia, hepatite, síndrome nefrótica e outros sintomas (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006; MERT Z et al., 1998; SUSO et al., 2018).

Figura 8 - Sífilis secundária – lesões palmares



8:

Fonte: AVELLEIRA; BOTTINO, 2006

Após a resolução das manifestações secundárias, a sífilis não tratada entra em um estágio latente em que manifestações estão ausentes e a infecção só pode ser detectada através de testes sorológicos. Para orientar o manejo, a sífilis latente é subdividida em sífilis latente precoce (diagnóstica a menos de um ano) e tardia (diagnóstica a mais de um ano), uma diferenciação que afeta

as decisões de tratamento e as recomendações de notificação do parceiro (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006; MERTIZ et al., 1998; SUSO et al., 2018).

A sífilis terciária estabelece-se após um período de anos ou até décadas. Com base em dados da era pré-antibiótica, cerca de um terço das pessoas com sífilis latente não tratada terá mais manifestações como neurosífilis tardia (paresia geral ou tabes dorsalis), sífilis cardiovascular ou sífilis gomosa. Sífilis Cardiovascular na maioria das vezes manifesta-se como formação de aneurisma da aorta ascendente, insuficiência valvar aórtica ou doença arterial coronariana. A sífilis gomosa (que pode ocorrer em praticamente qualquer local) são processos reativos e granulomatosos que levam a sintomas como resultado do seu efeito de massa ou inflamação local. Dentre a última parte do século XX, sífilis cardiovascular e sífilis gomosa tornou-se muito rara (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006; MERTIZ et al., 1998; SUSO et al., 2018).

A sífilis está especialmente relacionada a resultados adversos na gravidez, como aborto tardio, prematuridade, baixo peso ao nascer, morte neonatal e infecção congênita (BERMAN, 2004). A coinfeção do vírus da imunodeficiência humana e *T. pallidum* é relativamente comum e representa cerca de 25% da sífilis primária e secundária (CHESSON et al., 2005; KARP et al., 2009). A sífilis terciária em pacientes não infectados ou infectados pelo HIV é extremamente rara. Isto é provavelmente devido ao uso criterioso de antibióticos e tratamento precoce de casos de infecção primárias e secundárias (NGWANYA; KAKANDE; KHUMALO, 2017).

A formação de lesões provocada pela infecção do *T. pallidum*, principalmente na região genital, ocasiona uma via de entrada e de saída para o vírus HIV. Além disso, no local da lesão há um influxo de linfócitos T-CD4+ (célula alvo do HIV) e a presença do *T. pallidum* e suas lipoproteínas constituintes aumentam a expressão de correceptores CCR5 em macrófagos (célula alvo do HIV), aumentando a susceptibilidade de aquisição do HIV. Também, a infecção causada por esse patógeno está associado com alterações imunoviológicas representadas pela queda de LT-CD4+ e elevação da carga viral do HIV no plasma, visto principalmente na sífilis primária e secundária (CHARLTON et al., 2019; KARP et al., 2009; MATTEI et al., 2012; WAHAB et al., 2013).

O diagnóstico laboratorial da sífilis é efetuado de acordo com o estágio da infecção (PIRES; MIRANDA, 1998; AVELLEIRA; BOTTINO, 2006). Existe vários métodos de diagnósticos que foram desenvolvidos e classificados, uma vez que esse patógeno não pode ser mantido em cultura celular, como os de prova direta: Microscopia em campo escuro; Imunofluorescência direta; Pesquisa Direta com Material Corado; Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); os métodos de Provas Sorológicas: não treponêmicos (Reação de Wasserman (RW), Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) e Rapid Plasma Reagin (RPR)); treponêmicos (TPPA, fluorescent treponemal antibody absorption test (FTA-ABS), ELISA, Imunofluorimetria multiplex, Western Blot) e testes rápidos (TR) para Sífilis.

O exame de Microscopia em campo escuro e o de Imunofluorescência direta (padrão ouro) são métodos definitivos para a detecção da sífilis, mas usados apenas em sífilis primária e secundária. Os testes sorológicos para a sífilis no estágio inicial são relativamente insensíveis e os testes não treponêmicos ou teste treponêmicos podem detectar anticorpos a partir da 1 a 3 semanas após o desenvolvimento do cancro duro, tornando esses testes pouco específicos (KARP et al., 2009). A partir do início dos anos 90 os métodos moleculares (PCR e PCR em tempo real, mPCR) passaram a ser empregada para detecção de ácidos nucleicos treponêmicos, possuindo altas sensibilidade e especificidade (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006). Esse método vem utilizando diferentes tipos de amostras para a detecção do *T. pallidum* como: sangue total, soro, líquido amniótico, tecidos fixados e líquido cefalorraquidiano. A investigação desse patógeno usando esse método é de grande importância, pois a PCR permite detectar material genético do parasita a partir da amostra clínica coletada do indivíduo (KARP et al., 2009; RATNAM, 2005).

O tratamento da infecção causada por esse parasita é específico e altamente eficiente, sendo recomendado o tratamento simultâneo de parceiros sexuais para evitar a reinfecção. O medicamento padrão ouro é a Penicilina Benzatina. A penicilina é o fármaco utilizado para tratar a sífilis adquirida e congênita. As doses são administradas conforme o estágio em que o paciente se encontra. O Ministério da saúde recomenda o uso da penicilina G em gestantes com sífilis, pois é a única terapia com eficácia comprovada tanto para o tratamento das mesmas, como para prevenir a transmissão vertical para o

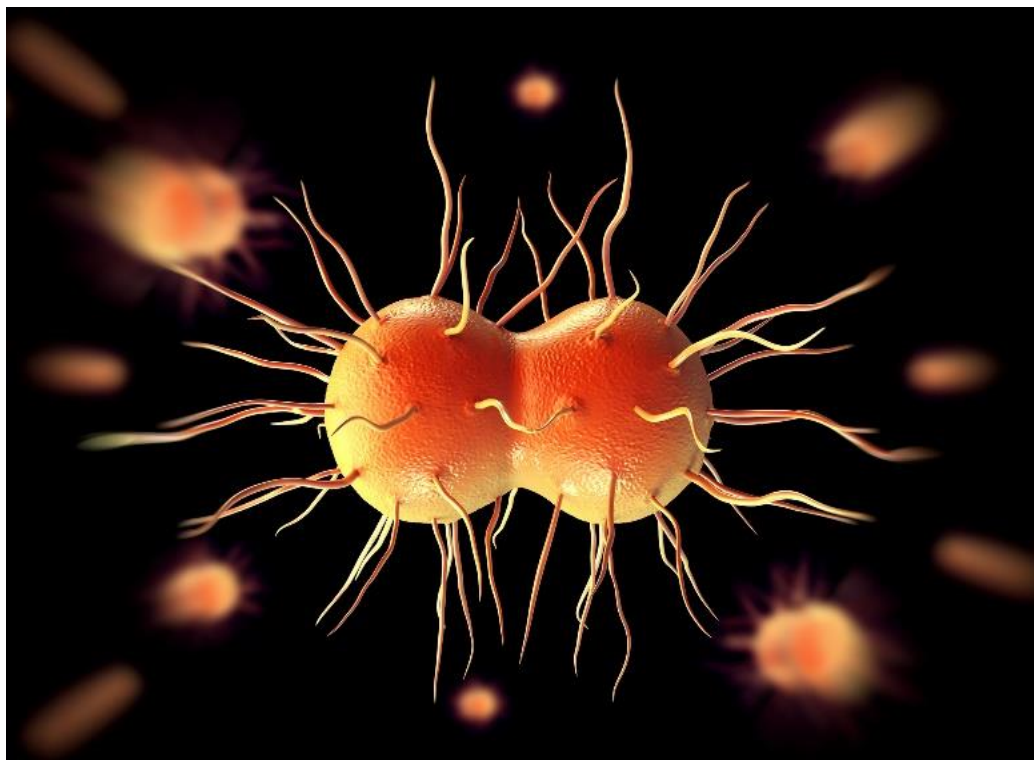
bebê, onde vem mostrando 98% de sucesso nessa prevenção. Quando se há pacientes alérgicos à penicilina, é recomendado fazer a dessensibilização para posteriormente administrar a medicação, principalmente em gestantes, pois outros fármacos são considerados inadequados para prevenir a transmissão fetal (MATTEI et al., 2012; HOOK, 2017; SUKTHANKAR, 2014).

2.4. *Neisseria gonorrhoeae*

A gonorreia é umas das infecções mais antigas conhecida pelos humanos. A infecção causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*) é conhecida desde tempos remotos e citadas em escritos chineses e na Bíblia Sagrada (Livro de Levítico), onde Moisés aconselhava medidas de higiene para o seu controle (PASSOS, 2005; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000; SCHIELKE; FROSCHE; KURZAI, 2010).

Albert Neisser, em 1879 descreveu a bactéria causadora da gonorreia que foi cultivada em 1882 por Leistikow e Loeffler quando denominaram *Neisseria gonorrhoeae*. A *N. gonorrhoeae* é um diplococo Gram-negativo, não flagelado, não formador de esporos, encapsulado, anaeróbio facultativo, com diâmetro entre 0,6 a 1,06 µm. Obtém-se crescimento em temperatura de 35 a 37 °C. Apresenta-se como duas estruturas reniformes justapostas, espelhadas pela concavidade e aproximadas pela extremidade, quase sempre agrupadas em massa no espaço extracelular e/ou no citoplasma dos polimorfonucleares abundantes (Figura 9). O gênero *Neisseria* apresenta cerca de 10 espécies saprófitas ou patogênicas ao homem, sendo a *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *N. pharyngis* e a *N. catarrhalis* as mais importantes (PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000; SCHIELE; FROSCHE; KURZAI, 2010).

Figura 9 - Diplococo Gram-negativo *Neisseria gonorrhoeae*



Fonte: <http://eureka.criver.com/wp-content/uploads/ThinkstockPhotos-463286087-1.jpg>

O genoma completo da bactéria *N. gonorrhoeae* possui cerca de 2.153.944 pb, depositada no GenBank com acesso número AE004969, podendo apresentar um plasmídeo críptico, vários plasmídeos produtores de beta-lactamase e diferentes plasmídeos conjugativos (FREDLUNDO et al., 2004). O material genético desse parasita possui uma característica diferente dos demais patógenos pois, apresenta 3 cópias do genoma completo em cada coco, portanto uma espécie poliploide (TOBIANSON; SEIFERT, 2010).

Acredita-se que o homem seja o único vetor e hospedeiro desse parasita bacteriano (EDWARDS; APICELLA, 2004; PASSOS, 2005). A gonorreia é uma doença infecciosa do trato urogenital, transmitida quase que exclusivamente pelo contato sexual (oral, vaginal ou anal) durante o intercuro sexual com indivíduos infectadas. Acomete primariamente as membranas mucosas do trato genital inferior e menos frequentemente aquelas do reto, orofaringe e conjuntiva. Entretanto, pode também ser transmitida através do trato genital materno para o recém-nascido durante o parto, causando oftalmia neonatal e infecções

sistêmicas neonatais (HILL; MASTERS; WACHTER., 2016; PENNA; HAJJAR; BRAZ, 2000; WHILEY; TAPSALL; SLOOTS, 2006).

O período de incubação do parasita no homem é de 2 a 5 dias, podendo variar de 1 a 10 dias. Os principais sintomas incluem o corrimento uretral e a disúria, geralmente sem aumento da frequência ou urgência urinária. O corrimento pode ser inicialmente mucóide, mas em 1 a 2 dias, torna-se purulento. Comparada à uretrite não-gonocócica, o período de incubação da gonorreia mostra-se menor, a disúria revela-se mais comum e o corrimento, mais abundante e purulento (Figura 10) (PENNA, HAJJAR, BRAZ, 2000).

Figura 10 - Corrimento uretral em paciente com gonorreia

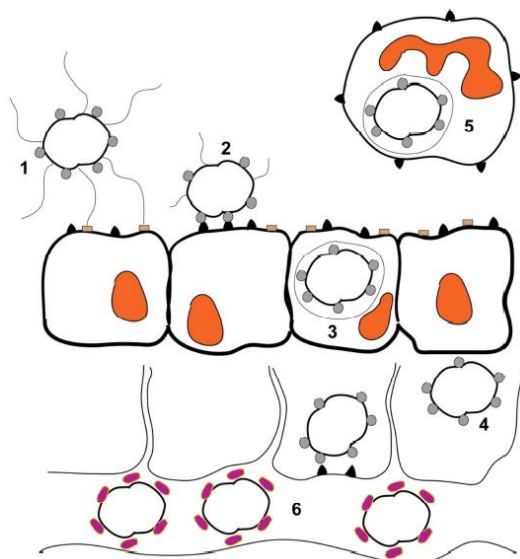


Fonte: PENNA, HAJJAR, BRAZ, 2000.

A *N. gonorrhoeae* inicialmente infecta o epitélio colunar. A ligação ao epitélio mucoso, mediada em parte pelos pilli e pela proteína Opa, é seguida em 24 a 48 horas pela penetração do organismo entre e através das células epiteliais para chegar ao tecido submucoso (Figura 11). Há resposta vigorosa de polimorfonucleares, com descamação do epitélio, desenvolvimento de microabscessos submucosos e formação de exsudato. Essa bactéria coloniza principalmente a uretra humana, o endocervix, as trompas de falópio e o útero. Este patógeno causa uretrite em homens, com sintomas inflamatórios óbvios, como uma secreção purulenta com um influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN). Nas mulheres, a infecção gonocócica apresenta-se como cervicite, vaginite, ou uma doença inflamatória pélvica mais grave. Além disso, infecção em mulheres é tipicamente assintomática (50 a 80%) ou desenvolvem

sintomatologia leve que não incita preocupação e busca de assistência médica, podendo levar a complicações graves, incluindo endometrite, salpingite, infecção gonocócica disseminada (DGI), além de facilitar a aquisição e transmissão do vírus do HIV. Se não tratada, essas complicações mais sérias podem resultar em esterilidade, gravidez ectópica, artrite séptica e ocasionalmente a morte (CHEMAITELLY et al., 2019; EDWARDS; APICELLA, 2004; HILL; MASTERS; WACHTER., 2016).

Figura 11 - Representação esquemática da infecção causada por *N. Gonorrhoeae*



Nota: 1. Os Pili do gonococo expressam a proteína OPA e interagem com o epitélio da mucosa. 2. Os pili são recolhidos e então ocorre um contato direto da bactéria através da proteína OPA com o antígeno CD66 localizado nas células da mucosa. 3. Após a fixação pela OPA, os gonococos são englobados e internalizados na célula. 4. Logo após a internalização, algumas bactérias podem transitar para o lado basolateral do epitélio da mucosa. 5. Dependendo da proteína OPA que esta sendo expressa, o gonococo pode residir e permanecer dentro do neutrófilo. 6. As bactérias podem então entrar na corrente sanguínea onde a sialilação torna elas resistentes ao soro (HILL; MASTERS; WACHTER., 2016).

Alguns mecanismos são propostos na associação do vírus do HIV e *N. gonorrhoeae* como: a presença da bactéria envoca uma resposta inflamatória no local da infecção com uma grande quantidade de linfócitos T-CD4 endocervicais (célula alvo do HIV); o aumento da excreção de partículas virais em mulheres com inflamação gonocócica e o aumento de neutrófilos polimorfonucleares presente na bactéria e a maior soroconversão do HIV-1 (DUARTE et al., 2003). A diminuição da carga viral do HIV é observada após o tratamento para a *N. gonorrhoeae*.

As infecções causadas por *N. gonorrhoeae* possuem uma associação com fatores sócio-econômicos e comportamentais. As taxas de prevalência das infecções por essa bactéria variam amplamente segundo a população pesquisada, o sítio de onde a amostra é coletada, teste utilizado para o diagnóstico, gênero, idade, etnia, sintomatologia e outros (LUPPI et al., 2011). Segundo a OMS, em 2011 o número de casos de gonorreia no mundo foi de aproximadamente 88 milhões, o Brasil no mesmo ano apresentava uma prevalência de 1,5 milhões de casos e nos EUA o número de casos existente foi de 400 mil (WHO, 2011).

A gonorreia é a segunda IST bacteriana de maior prevalência no mundo, sendo a primeira ocupada pela *Chlamydia trachomatis*. Em 2012, a estimativa da taxa global de infecção por *N. gonorrhoeae* foi de 19 casos por 1.000 mulheres e 24 casos por 1.000 homens, o que se sugeriu uma exposição de mais de 75 milhões de pessoas à infecção a cada ano no mundo. Destes casos, a estimativa foi de 11 milhões na região das Américas, 4,7 milhões na região Europeia, 11,4 milhões na região Africana, 4,5 milhões na região do Mediterrâneo oriental e uma discrepância maior em números de casos foi registrado na região ocidental, 35,2 milhões (NEWMAN et al., 2015).

Atualmente, a estimativa global da prevalência de casos de infecções causadas pela bactéria *N. gonorrhoeae*, é de 8%. No Brasil, a falta de estudos epidemiológicos e a escassez de informações sobre a epidemiologia causada por essa bactéria dificulta o conhecimento da verdadeira prevalência dessa infecção no país, que varia entre 7 e 18% de infecções por *N. gonorrhoeae* em homens e mulheres. A escassez de informações, se deve principalmente o fato dessa infecção não ser considerada de notificação compulsória. Dessa forma, as informações disponíveis sobre a prevalência são baseadas em estudos feitos de uma pequena parcela da população, o que certamente não reflete o cenário do território brasileiro (FERNANDES et al., 2018). Estudos epidemiológicos em diferentes regiões no Brasil mostram a prevalência da gonorreia, que apresentam similaridade entre os resultados desses trabalhos descritos na literatura, como elencados no quadro 3.

Quadro 3 - Estudos epidemiológicos sobre a prevalência de infecção pela *N. gonorrhoeae* em mulheres no Brasil

Local	População	Métodos de diagnóstico	Prevalência (%)	Autor
Belo Horizonte/MG	Mulheres atendidas em uma Clínica geral e um Centro de referência	qPCR-Multiplex	4,8	LIMA et al., 2018
Rio de Janeiro/RJ	Mulheres com alterações citológicas	PCR	1,8	BRITO et al., 2018
Manaus/AM	Mulheres HIV-positivas	qPCR	0,9	MIRANDA et al., 2017
Salvador/BA	Mulheres HIV-positivas	qPCR	12,3	TRAVASSOS et al., 2016
São Paulo/SP	Mulheres em exame ginecológico de rotina	PCR	1,9	LUPPI et al., 2011
Curitiba/PR	Mulheres em exame ginecológico de rotina	PCR	1,5	PIAZZETA et al., 2011
Manaus/AM	Mulheres atendidas em clínica de DST	Cultura	7,1	BENZAKEN, 2010
Vitória/ES	Mulheres em exame ginecológico de rotina	Cultura	2,0	BARCELOS et al., 2008
Manaus, Fortaleza, Goiânia, Rio de Janeiro, São Paulo e Porto Alegre	Mulheres gestantes	Captura híbrida	1,5	CAMPOS et al., 2008

Pacoti/CE	Estudo de base populacional	PCR	1,2	OLIVEIRA et al., 2007
Fortaleza e Aracati/Ceará	Mulheres atendidas em primeira consulta do pré-natal pelo SUS	PCR	1,3	MARTINS et al., 2004
Manacapuru/Am	(MPS)	Cultura	39,5	BENZAKEN et al., 2002

Nota: **qPCR** (PCR em tempo real), **PCR** (reação em cadeia da polimerase), **MPS** (Mulheres Profissionais do Sexo).

O diagnóstico da *N. gonorrhoeae* pode ser feito pelo Gram, microscopia de esfregaços manchados, cultura ou por testes de amplificação de ácidos nucleicos (TAAN). As técnicas comercialmente disponíveis para detecção da *N. gonorrhoeae* possuem uma alta sensibilidade e especificidade (90-100%), variando de acordo com a técnica empregada. A cultura é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico dessa bactéria, feita em meio próprio (Thayer-Martin ou agar-chocolate) pois é considerada uma bactéria fastidiosa, onde a partir de amostras endocervicais ou uretrais apresenta sensibilidade de 85-95% em infecções agudas, mas em infecções antigas pode chegar no máximo a 50%. O teste de cultura de células possui alta sensibilidade e especificidade, é barato e adequado para a maioria de tipos de amostras, permitindo também testes de suscetibilidades à antibióticos e caracterização de linhagens de *N. Gonorrhoeae*. Por outro lado, a cultura para fins de diagnósticos não é viável pois, consome muito tempo (FREDLUND et al., 2004; NG; MARTIN, 2005; UNEMO; SHAFER, 2014; WHILEY; TAPSALL; SLOOTS, 2006).

O início da década de 90 foi um importante avanço no diagnóstico da *N. gonorrhoeae*, principalmente pelo desenvolvimento dos métodos moleculares, que consiste na amplificação de um fragmento ou sequência de DNA gonocócico, através da PCR ou PCR em tempo real. Podem ser usadas como amostras, secreções endocervical ou uretral colhidos por *swab* (inclusive autocoleta vaginal) ou ainda urina. Possuem como vantagens a possibilidade de diagnóstico em indivíduos assintomáticos (sendo uma opção interessante para rastreio), além de poderem utilizar material não invasivo (urina ou material vaginal) que podem ser colhidos facilmente da paciente sem causar desconforto,

e é adequado na detecção do parasita em amostras que podem não conter o organismo viáveis devido ao longo tempo de transporte ou exposições a condições extremas. Porém, tem uma desvantagem de não discriminar a infecção presente ou passada, pois o DNA gonocócico pode permanecer por semana após tratamento (FREDLUND et al., 2004; NG; MARTIN, 2005; VAN DOORNUM et al., 2001; WHILEY; TAPSALL; SLOOTS, 2006).

A *N. gonorrhoeae* rapidamente adquiriu resistência a diferentes tipo de antibióticos (sulfonamidas, penicilinas (primeira geração), cefalosporinas, tetraciclina, macrolídeos, fluoroquinolonas) usados nos últimos anos 70-80, através de vários mecanismos, incluindo a aquisição de plasmídeos que codificam a resistência à b-lactamase e tetraciclina e mutações pontuais em genes cromossômicos que aumentam a resistência a antibióticos b-lactâmicos, macrolídeos e fluoroquinolonas. O gonococo também adquire resistência através da captação de DNA de outras cepas gonocócicas ou *Neisseria sp.*, Que é o mecanismo genético pelo qual a resistência às cefalosporinas de espectro estendido evoluiu. Tornando uma preocupação mundial sobre a resistencia as diferentes classes de antibióticos (ABRAMS; TREES, NICHOLAS et al., 2015; FERREIRA et al., 2015; UNEMO; SHAFER, 2014).

O tratamento recomendado para a gonorreia atualmente, é o uso duplo de ceftriaxona com azitromicina ou doxiciclina. Essa recomendação de tratamento está embasada, principalmente, devido a capacidade da bactéria de adquirir ou desenvolver resistência antimicrobiana (AMR). As medidas efetivas de controle da gonorreia dependem de sexo seguro, aconselhamento, diagnóstico apropriado, notificação e tratamento melhorados de parceiros e expansão de intervenções direcionadas para populações vulneráveis (profissionais do sexo, HSH, adolescentes e pacientes com ISTs e seus parceiros sexuais) e terapia antimicrobiana. o último dos quais está em perigo por cepas resistentes a múltiplas drogas (WI et al., 2017; VINCENT; JERSE, 2018; BAZZO et al., 2018).

2.5. Métodos moleculares de diagnóstico

O desenvolvimento da biologia molecular foi uma das maiores conquistas na ciência biológica no século XX. Os métodos moleculares de diagnósticos de microrganismos sexualmente transmissíveis são técnicas laboratoriais sofisticadas e sensíveis. A descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) trouxe enormes benefícios e desenvolvimento científico como o sequenciamento do genoma, expressões gênicas em sistemas recombinantes, estudo de análises genéticas moleculares, incluindo a rápida determinação da paternidade e do diagnóstico de doenças infecciosas (SPEERS et al., 2003).

A PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel em 1994. A PCR imita o processo de replicação *in vivo*. A reação ocorre em um microtubulo de plástico, sendo necessário alguns componentes (água, tampão, magnésio, DNTPs, primers, enzima taq polimerase e DNA molde) para que ocorra a reação. A técnica permite *in vitro* a síntese de fragmentos de DNA usando uma enzima DNA-polimerase, que leva parte na replicação do material genético celular. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de DNA, onde um pequena fragmento (*primer*) é conectado a uma das cadeias de DNA no local específico escolhido para iniciar a síntese. *Primers* limitam a sequência a ser replicada e o resultado é a amplificação de uma sequência específica de DNA com bilhões de cópias, permitindo a visualização através da técnica de eletroforese no gel de agarose (MULLIS, K. B., 1990; BERMINGHAM; LUETTICH, 2003)

A partir da versatilidade da técnica de PCR convencional, foi possível o desenvolvimento de numerosas variantes, buscando sempre melhorar essa técnica, pois o sucesso da amplificação de DNA pela técnica da PCR convencional está dependente de diversos fatores, como a presença de inibidores, a quantidade de DNA, o estado de degradação do DNA, entre outros. Dentre essas variantes as mais comuns são: PCR nested (N-PCR), PCR em tempo real (qPCR), PCR por transcriptase reversa (RT-PCR), PCR semi-quantitativo (PCRSQ) e a PCR *multiplex* ou PCR múltiplo (mPCR).

2.6. Ensaio de PCR *multiplex*

A técnica de PCR *multiplex* ou PCR múltiplo (mPCR) é uma variante da PCR desenvolvida em 1988 com o objetivo de promover a diferenciação de

várias espécies ou entre vários gêneros simultaneamente, sendo considerado que a reação acontece em um teste único e altamente específico (OLIVEIRA et al., 2007). A mPCR possui uma vantagem adicional na triagem, pois utiliza mais de um par de iniciadores, permitindo a detecção simultânea de múltiplos patógenos, reduzindo custos e tempo (SOUZA, et al., 2013; TURCHI, et al., 2004).

O ensaio de mPCR utiliza, em uma única reação, três ou mais pares de iniciadores específicos para um ou mais genes de cada patógeno. O diagnóstico através da mPCR só é possível se a temperatura de anelamento dos pares de *primers* forem semelhantes e os produtos (*amplicons*) gerados por esses iniciadores apresentarem tamanhos distintos para que possa haver a diferenciação no momento na revelação, através do gel de agarose (ROSSETTI, SILVA, RODRIGUES, 2006).

O uso da técnica de mPCR possui vantagens como: menor tempo na obtenção do resultado e maior economia de reagentes quando comparado com a realização de uma PCR convencional para microrganismos individualmente (ROSSETTI, SILVA, RODRIGUES, 2006). A mPCR pode ocorrer interações inespecíficas como os dímeros de *primers*, uma vez, que haverá na mesma reação vários pares de *primers*, então, para diminuir essas inespecificidades da reação é necessário uma atenção especial nos parâmetros de desenho dos iniciadores como: homologia dos primers com a sequência alvo, comprimento dos iniciadores, conteúdo de GC e concentração. Durante a otimização das condições da reação de mPCR é de grande importância para o sucesso da técnica levar em consideração a concentração de *primers*, concentração de tampão de PCR, o equilíbrio entre as concentrações de MgCl₂ e dNTPs, temperatura da ciclagem da reação, quantidade de DNA molde e enzima (MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2002).

A PCR evoluiu no campo do diagnóstico molecular de doenças infecciosas. Na tentativa de superar as desvantagens dessa técnica como o alto custo, foi desenvolvido a mPCR para detecção de agentes virais, bacterianos e/ou outros agentes infecciosos em um tubo de reação (MARKOULATOS; SIAFAKAS; MONCANY, 2001). A investigação através da mPCR constitui uma importante alternativa para detecção simultânea do DNA de mais de um patógeno sexualmente transmissível, em uma única reação, que é de suma

importância pois, diminui custo e tempo, além de possibilitar a análise desses microrganismos que muitas vezes não apresentam sintomas e acarretam grandes prejuízos, principalmente, para a saúde reprodutiva da mulher.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Desenvolver um ensaio de PCR *Multiplex* para pesquisar a presença de *Trichomonas vaginalis*, *Treponema pallidum* e *Neisseria gonorrhoeae* em amostras cervico-vaginais de mulheres ribeirinhas do município de Coari.

3.2. Específicos

- Desenvolver iniciadores específicos para detecção simultânea dos três referidos microrganismos usando a PCR *Multiplex*;
- Otimizar o ensaio de PCR *Multiplex* para detecção dos três referidos patógenos em amostras cervico-vaginais obtidas por autocoleta;
- Determinar a prevalência desses patógenos em mulheres ribeirinhas do município de Coari;
- Identificar o perfil epidemiológico e de risco das mulheres infectadas com os referidos patógenos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo e Local de coleta

Trata-se de um estudo epidemiológico molecular descritivo de corte transversal que foi realizado com mulheres moradoras da zona rural do município de Coari no Amazonas, usando amostras de autocoleta para pesquisa de patógenos causadores de IST por métodos moleculares.

O local de coleta das amostras do presente trabalho foi realizado no município de Coari/Am (Figura 12), que se situa a 363 Quilômetros (Km) da cidade de Manaus, a parte urbana localiza-se às margens do lago de Coari, no Rio Solimões. Existem atualmente na zona rural 405 comunidades ribeirinhas distribuídas em 7 calhas de rios. Segundo dados do IBGE (2018) o município tem uma população estimada em aproximadamente 84.272 habitantes, o que a coloca na posição de quinto maior município do Amazonas. É uma das cidades mais ricas da região Norte do Brasil, devido à exploração de gás e petróleo em suas terras. Portanto, com o desenvolvimento do município houve um aumento do fluxo de pessoas e a possível mudança nos padrões de comportamento sexual, fator relevante para o aparecimento de IST.

Figura 12 - Localização geográfica do Município de Coari no Amazonas



Fonte: Google (Adaptado por Reis 2017).

4.2. Aspectos Éticos

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado: “Diagnóstico de Infecções Sexualmente Transmissíveis em Mulheres Ribeirinhas – a Autocoleta como Estratégia acessível a todos”, cujo objetivo geral é estudar a prevalência de patógenos sexualmente transmissíveis em mulheres ribeirinhas utilizando amostras obtidas por autocoleta e Kits multi-diagnóstico.

O projeto foi aprovado pelo Edital: Projetos Jovens Doutores (**Edital 041/2017/PROPESP/UFAM**) e no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (**CAAE 62552716.1.0000.5020**). O estudo também contou com a parceria da secretaria Municipal de Saúde de Coari, o gestor maior (Secretário de Saúde), na qual o apoio foi de grande importância para a realização do projeto, principalmente para as visitas nas comunidades mais distantes, pois a equipe fez algumas das viagens na Unidade básicas de Saúde Fluvial (UBSF) organizadas pela Secretaria do Município.

4.3. População de Estudo

As amostras foram autocoletadas de mulheres moradoras da Zona Rural do município de Coari. As comunidades foram escolhidas por conveniência logística, garantindo-se, que só fossem incluídas aquelas cujo acesso fosse unicamente por via fluvial. O período de coleta ocorreu em 08/12/2017 a 19/08/2018. Essas comunidades localizam-se nas regiões do Alto Rio Solimões, médio Rio Solimões, Baixo Rio Solimões, Lago do Mamiá, Rio Copeá, Lago de Coari e Ilha do Ariá.

4.4. Critérios de inclusão/exclusão

Critérios de inclusão

- Mulheres sexualmente ativas
- Mulheres acima de 18 anos

Critérios de Exclusão

- Gestantes
- Mulheres que estivessem no período menstrual

- Mulheres que estivessem fazendo uso de medicamentos por via vaginal nos últimos sete dias

4.5. Cálculo do *N* amostral

Para o cálculo amostral da quantidade estimada de amostras necessárias para realização do projeto “Diagnóstico de Infecções Sexualmente Transmissíveis em Mulheres Ribeirinhas – a Autocoleta como Estratégia Acessível a Todas”, foi considerada a prevalência de 42% de IST em geral (BRASIL, 2008) com margem de erro de 5% e confiança de 95%, tendo sido obtido um “n” de 385.

4.6. Coleta de amostras biológicas, de dados e procedimento de análises

Com base no cálculo amostral mínimo de 385 previamente estabelecido, obteve-se um total de 420 amostras de mulheres residentes em 78 comunidades da zona rural do município de Coari que aceitaram participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e preenchimento do questionário padrão.

O desenvolvimento do estudo ocorreu em duas etapas diferentes. A primeira etapa consistiu em: reuniões do grupo GP autocoleta, abordagem das mulheres, coletas de dados epidemiológicos, instruções sobre a autocoleta, coleta das amostras (Figura 13). A segunda etapa correspondeu na extração do DNA das amostras autocoletadas, PCR de DNA Genômico Humano, técnica de Eletroforese, desenho de *primers*, validação dos iniciadores, gradientes de temperatura dos iniciadores, otimização da reação de PCR multiplex, aplicação da técnica de PCR multiplex nas amostras e visualização do produto na técnica de Eletroforese gel de agarose (Figura 14). As etapas do estudo estão elencadas nos fluxogramas a seguir nas Figuras 13 e 14.

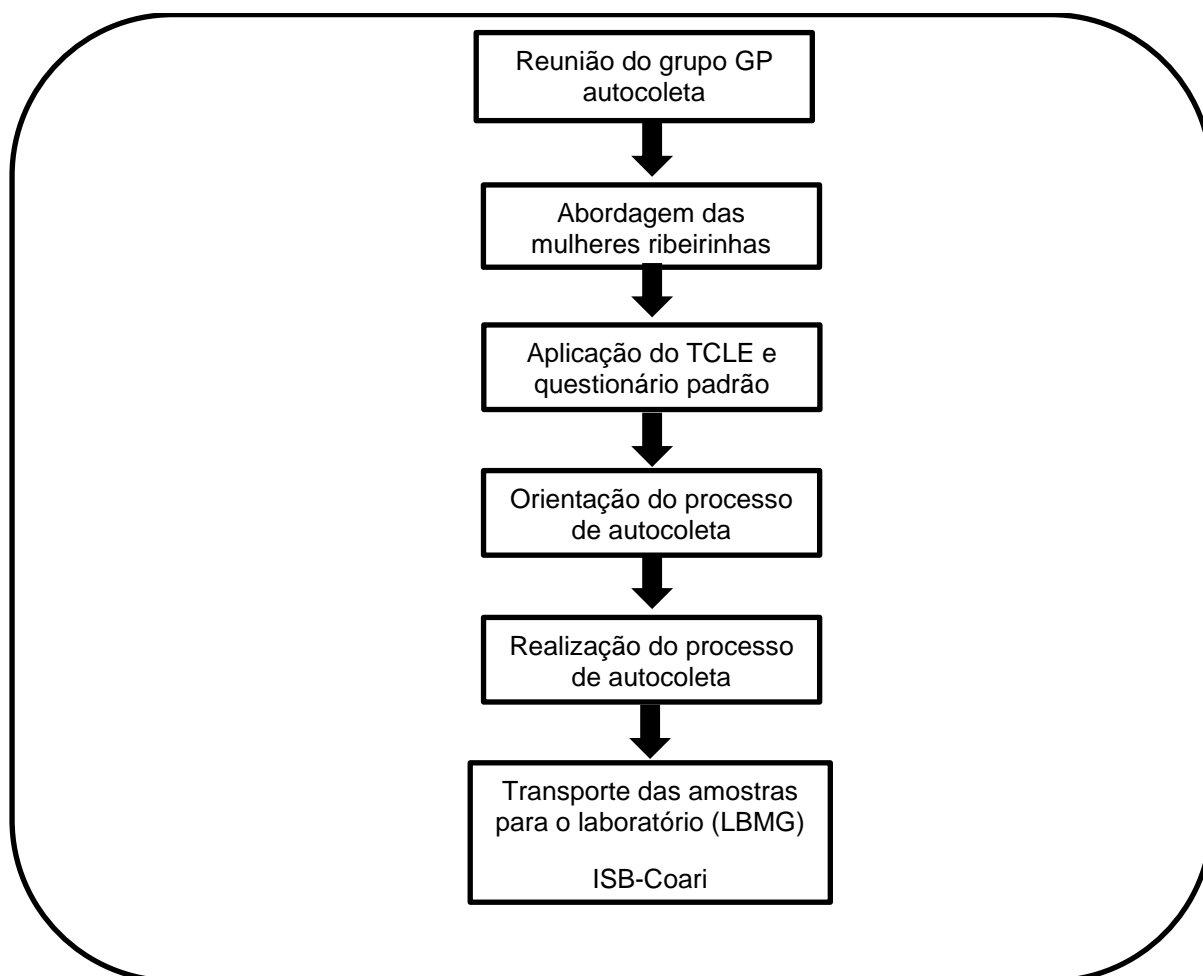
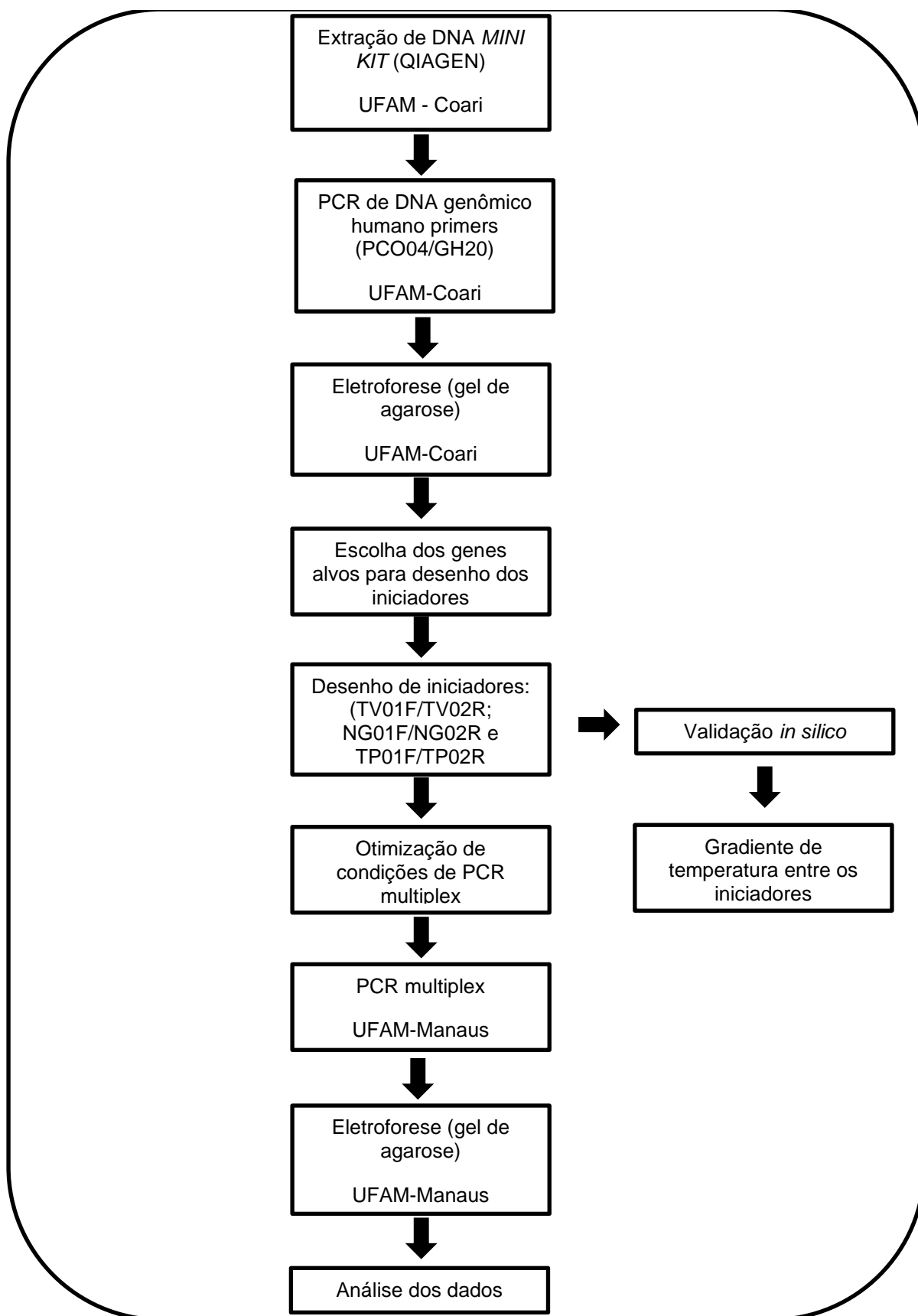
Figura 13 - Fluxograma 01 da primeira etapa de atividades do projeto

Figura 14 - Fluxograma 02. Segunda etapa de atividades do projeto

4.7. Coleta de amostras biológicas e coleta de dados

As comunidades visitadas foram escolhidas por conveniência logística. As viagens foram organizadas em concordância com os membros do grupo de pesquisa (GP autocoleta), nas reuniões do grupo ficava decidido todos os detalhes para se chegar até as mulheres ribeirinhas como: embarcações, mantimentos, aviso antecipado as mulheres, organização do material necessário para a aplicação do estudo dentre outros.

Após as decisões das comunidades escolhidas para as visitas, as mulheres eram avisadas através de comunicados feito pela rádio rural de Coari, avisando a chegada do grupo no local. A partir de então, a equipe era deslocada as comunidades ribeirinhas, através de lanchas rápidas, barcos ou na Unidade básica de Saúde Fluvial (UBSF).

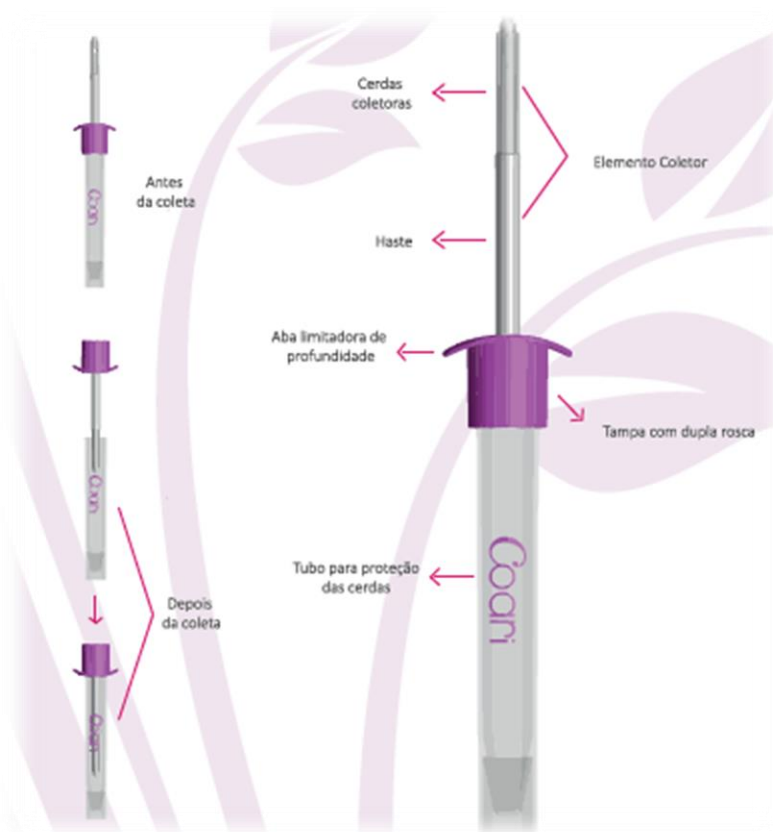
Chegando nas localidades, era reforçado o objetivo do grupo para o líder comunitário e o Agente Comunitário de Saúde (ACS) que passava reforçando o convite nas residências de cada moradora. Em comunidades em que não se faziam presentes o líder comunitário e o ACS, as explicações relativas aos objetivos do projeto eram feitas pelos membros do grupo, assim como o convite para a participação delas. Então, era feito a abordagem “de casa em casa” para recrutamento das mulheres, onde inicialmente elas foram convidadas a participar deste estudo e ao aceitarem e se enquadrarem nos critérios de inclusão/exclusão, responderam a um questionário-padrão (Anexo 1), onde foram registradas informações pessoais, clínicas, sócio-econômicas e comportamentais, além de opiniões relativas à aceitação ou não da autocoleta. Receberam também, explicações relativas ao projeto de pesquisa e em sua totalidade assinaram o TCLE (Anexo 2).

Antes de realizarem a autocoleta as mulheres receberam instruções relativas à técnica com auxílio de uma cartela de imagens (Anexo 3). As informações consistiam em que as mulheres deveriam higienizar as mãos, abrir a embalagem (conforme a ilustração), retirar o dispositivo da embalagem segurar o tubo (sem tocar nas cerdas coletoras), adotar posição confortável para coleta (conforme ilustração), inserir as cerdas coletoras na vagina (não ultrapassando a aba limitadora de profundidade), girar o dispositivo por 5 voltas completas para

coletar o máximo possível de material, retirar o dispositivo tomando cuidado para não tocar nas cerdas. A seguir, elas deveriam desrosquear a tampa até liberá-la do tubo, introduzir cuidadosamente as cerdas no tubo e rosquear até o fechamento firme e completo do conjunto tubo-haste. Após as orientações, as mulheres realizaram a autocoleta em um ambiente privado em sua casa (quarto ou banheiro) e em seguida entregaram o dispositivo ao entrevistador.

As escovas contendo o material cervico-vaginal foram colocados em saquinhos apropriados e identificados, sendo armazenados a temperatura ambiente. Posteriormente foram então transportados para o Laboratório de Biologia Molecular e Genética do Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB) da UFAM em Coari e mantido na geladeira à -20°C . A autocoleta vaginal foi realizada com o auxílio da escova COARI®, da Kolplast® (Figura 15).

Figura 15 - Detalhamento do dispositivo usado na autocoleta



4.8. Processamento laboratorial das amostras

As atividades laboratoriais do estudo compreendem duas etapas, a primeira toda realizada nas dependências do laboratório de Biologia Molecular e Genética, do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do

Amazonas (ISB - UFAM), em Coari e a segunda foi realizada no laboratório de Diagnóstico Molecular do Bloco “M”, setor sul Campus UFAM/Manaus.

4.9. Extração de DNA

Conforme acima descrito, o processamento laboratorial das amostras aconteceu no Laboratório de Biologia Molecular e Genética do Instituto de Saúde e Biotecnologia (ISB) onde foi realizada a extração do DNA das amostras usando kit ReliaPrep™ (Promega®), conforme as instruções do fabricante (Anexo 4).

4.10. Técnica de PCR para detecção de DNA Genômico Humano

A verificação da eficiência e qualidade da extração de DNA foi realizada através de uma PCR para amplificação do DNA genômico humano usando o par de *primers* PCO3/PCO4 (PCO3: 5' CTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGC 3' e PCO4: 5' TCACCACAACCTTCATCCACGTTCCACC 3') que amplifica um fragmento de 110 pares de bases (pb) para o gene β -globina humana (VENCESLAU et al., 2014). Os componentes da reação consistem em: 2,5mM de cada dNTPs, 2 mM de MgCl₂, 10 μ M de cada *primer* (PCO3 e PCO4), 0,2U/ μ L Taq DNA polimerase, 2,5 μ L de DNA e água para completar o volume final de 25 μ L. A reação foi realizada em Termociclador *Veriti* (Applied Biosystems) nas condições abaixo descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições da PCR do DNA genômico humano usando os primers PCO3 e PCO4

Números de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Reação
1	94	5	Desnaturação inicial
	94	1	Desnaturação
40	55	1	Anelamento
	72	1	Extensão
1	72	10	Extensão Final

Nota: **Min**= minutos

4.11. Técnica de Eletroforese

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese (técnica de separação de moléculas), mediante a migração em gel de agarose (LW Biotec) a 1,5 % em tampão TEB (Tris borato e EDTA – DNA Express Biotecnologia) 1X, sob diferentes condições de voltagem: 70 Volts até a entrada da amostra no gel, aumentando a voltagem para 100 volts até a amostra chegar ao final da corrida,

em um tempo aproximado de 45 minutos. Como marcador de peso molecular foi usado um *Ladder* de 100 pb (Invitrogen Life Technologies, São Paulo, Brasil). O gel foi corado com Brometo de etídio (1,0 µg/mL) e posteriormente analisado em luz ultravioleta (UV) e fotodocumentadas no equipamento *Transiluminator Loccus Biotecnologia*. O fragmento amplificado esperado corresponde a 268 (para β-globina humana).

O processo laboratorial acima foi realizado no ISB situado no município de Coari. Posteriormente, as amostras de DNA foram transportadas para o laboratório de Diagnóstico Molecular bloco “M” nas dependências da Universidade Federal do Amazonas, Setor Sul/campus Manaus e armazenadas em freezer para posterior análises usando métodos moleculares de PCR multiplex, conforme previsto no plano de trabalho.

4.12. Escolha de genes e desenho de iniciadores

4.12.1. Seleção de genes alvos

A seleção dos genes alvos para o desenho dos *primers* foi baseado na literatura. Para cada microrganismo foi feito uma busca em trabalhos (artigos, teses e dissertações) anteriores disponíveis nas plataformas para que a partir de então, fosse desenhado os iniciadores específicos que flanqueassem uma região gênica de cada patógeno. O gene escolhido para *T. vaginalis* foi o gene *beta-tubulina*, para *N. gonorrhoeae* o pseudogene *porA* e para *T. pallidum* o gene *pol A*. As sequências dos genes escolhidos depositadas no NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), onde é possível buscar a sequência de cada gene específicos desses microrganismos.

O gene *beta-tubulina* encontrado no genoma linear do *T. vaginalis* possui 1.387 pb. Esse mesmo gene codifica proteínas de composição dos microtúbulos, que forma os axóstilos responsável pela estrutura do *T. vaginalis*, esse gene também é expresso em outros organismos, porém, possui uma sequência específica do *T. vaginalis* (MADICO et al., 1998).

O pseudogene *porA* específico da *N. gonorrhoeae* possui 1.329 pb. Esse gene codifica proteínas de membrana de grande importância para a bactéria, pois controla a entrada e saída de nutrientes para a célula (UNEMO; NORLEN; FREDLUND, 2005; HILL; MASTERS; WACHTER., 2016).

O gene *pol A* é expresso em diferentes organismos, no *T. pallidum* esse gene possui 2.994 pb e o produto expresso por esse gene é a proteína DNA polimerase I, envolvida no reparo de DNA e na replicação da maioria das bactérias, esse gene possui uma sequência única do *T. pallidum* (LIU, et al., 2001).

4.12.2. Desenhos dos iniciadores

O desenvolvimento dos *primers* foi feito através do programa IDT DNA (<https://www.idtdna.com/pages>). O desenho seguiu alguns parâmetros como: comprimento dos *primers*, tamanho do produto gerado, conteúdo de GC, temperatura de anelamento e outros, necessários para desenhar iniciadores (RODRÍGUEZ et al., 2015).

4.12.3. Validação dos iniciadores

Para a realização da mPCR é necessário que seja feita a análise dos iniciadores quanto a formação do grampo de cabelo (Hairpin), a formação de auto-dímero, ou seja, que os iniciadores se liguem com eles mesmos (Self-dimer) e a formação de estrutura secundária entre os diferentes *primers* na mesma reação (Hetero-dimer). Esta análise foi feita no programa IDT DNA, a energia de interação desses iniciadores pode ser aceita entre -5 e 5, uma vez que, valores mais próximos do positivo diminuem a formação de estruturas indesejáveis. Após a investigação quanto a formação de estruturas indesejáveis na reação, também foi feita validação *in silico* dos iniciadores, usando o programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ferramenta básica de busca de alinhamento local, que encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas. O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas com banco de dados, possibilitando determinar o grau de especificidade dos iniciadores com o microrganismo em análise.

4.12.4. Otimização de condições de PCR multiplex

Para a otimização da reação final, foi feito um gradiente de temperatura de anelamento dos três iniciadores individualmente, objetivando obter uma temperatura ideal para os três pares de *primers* se anelarem igualmente, pois é de suma importância que os iniciadores em uma PCR multiplex se anelem na mesma temperatura. O gradiente de temperaturas foi programado no termociclador para: 55°C, 56,2°C, 58°C e 59°C. Portanto, os três respectivos iniciadores tiveram uma temperatura ideal de 55°C. Após a determinação da temperatura de anelamento, foi iniciado a determinação do protocolo da PCR multiplex, quanto as concentrações e volumes de reagentes.

4.13. Detecção molecular dos Patógenos

Para o diagnóstico dos patógenos nas amostras cérvico-vaginais das 420 mulheres, foi realizada uma PCR multiplex convencional e visualizada no gel de agarose a 2%. Os iniciadores utilizados para analisar a presença do *T. vaginalis* anelam uma região bem conservada do gene *beta-tubulina*. As sequências estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Primers utilizados na detecção de *T. vaginalis*

Patógenos	Iniciadores	Sequências (5'3')	Tamanho do Amplicon
	TV01F	CATTGATAACGAAGCTCTTTACG	
<i>T. vaginalis</i>	TV02R	ATGGAAACAAGGTGGTTAAGA	90 pb

A detecção de *N. gonorrhoeae* foi realizada utilizando os pares de iniciadores que amplificam uma sequência de 140 pb do pseudogene *porA*. As Sequências estão elencadas na tabela 3.

Tabela 3 - Primers utilizados na detecção de *N. gonorrhoeae*

Patógenos	Iniciadores	Sequências (5'3')	Tamanho do Amplicon
	NG01F	TGTATTATGCCGGTCTGAATTA	

<i>N. gonorrhoeae</i>	NG02R	TTTCAATGGATCGGTATCACT	140 pb
-----------------------	-------	-----------------------	--------

O par de iniciadores utilizados para investigar a presença do *T. pallidum* foi desenvolvido usando uma sequência conservada do gene *polA*, que amplifica 192 pb. A tabela 4 está elencada as referidas sequências.

Tabela 4 - Primers utilizados na detecção de *T. pallidum*

Patógenos	Iniciadores	Sequências (5'3')	Tamanho do Amplicon
	TP01	AAACGATACATTACAAATGACAGA	
<i>T. pallidum</i>	TP02	GCATAACATCCTGCCTAAGA	194 pb

O sistema de reação utilizou-se de um controle positivo para cada microrganismo. As amostras positivas para *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae* foram extraídas de Cultura celular e para *T. pallidum* foi extraída de úlcera (sífilis primária), cedidas pela Fundação Alfredo da Matta (FUAM). No teste também foram utilizado um controle negativo (água Milli-Q no lugar da amostra).

A PCR multiplex foi preparada para um volume final de 25 µL, utilizando os três pares de *primers* juntos na mesma reação. Os reagentes, concentrações e volumes estão descrito na Tabela 5.

Tabela 5 - Reagentes, concentrações e volumes utilizados no sistema de reação da PCR multiplex

Reagentes	Volumes (µL)
H2O	6,5
Tampão 2X	2,5
MgCl ₂ 50 mM	0,8
DNTPs 2,5 mM	0,5
TV 01 5pmol	2
TV 02 5pmol	2
NG 01 5pmol	2

NG 02 5pmol	2
TP 01 5pmol	2
TP 02 5pmol	2
Platinum taq DNA polimerase (5U/ μ L)	0,2
DNA	2,5
Volume final da reação	25

Para a realização da amplificação, foi programado no termociclador condições de temperaturas ideal para a reação final, mostrada na Tabela 6.

Tabela 6 - Condições de amplificação da reação de PCR multiplex

CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1	Desnaturação	95	5 Seg
	Desnaturação	95	30 Seg
35	Anelamento	55	30 Seg
	Extensão	72	30 Seg
	Extensão final	72	30 Seg
1	Manutenção/Hold	4	5 Min

Nota: **Seg**= segundo; **Min**= minuto

Todas as reações de PCR foram realizadas em um termociclador (APPLIED BIOSYSTEMS). Os produtos das PCR foram submetidos a técnica de eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo (1 μ g/ μ L), em tampão TBE 1X (Tris borato e EDTA), sob tensão elétrica de 80 (até a saída do poço) e 110 (após a saída do poço) Volts por, aproximadamente, 55 minutos. Aplicou-se alíquotas com um volume final de 13 μ L composto de: 3 μ L de tampão de amostras (Azul de bromofenol) e 10 μ L do produto da PCR. Foi utilizado como o marcador de pares de bases o *ladder* de 50 pb da *Invitrogen Life Technologies*. A visualização dos géis foi feita com o auxílio de um transluminador (*major science*) e fotodocumentadas.

4.14. Construção de banco de dados e análise estatística

Os dados foram tabulados e analisados com o auxílio dos programas SPSS versão 2.0 para Windows. Os resultados estão apresentados em tabelas e gráficos, sobre a forma de frequência absoluta e relativa e/ou média ou mediana. A análise de diferença de proporções e análises de associação ou não entre as variáveis foi realizado utilizando o teste de Qui-quadrado de Pearson (χ^2) e/ou o teste de Fisher para os casos em que a frequência fosse menor a ($p < 0,05$). O nível de significância fixado na aplicação dos testes foi de 5%, com um intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização geral da população em estudo

Conforme descrito no item material e métodos, com base no cálculo amostral mínimo de 385 previamente estabelecido, obteve-se um total de 420 amostras de mulheres residentes em 78 comunidades da zona rural do município de Coari que aceitaram participar do estudo mediante assinatura do TCLE e preenchimento do questionário padrão. A Tabela 7 elenca as regiões, o número de comunidades e a quantidade de amostras autocoletadas de acordo com as comunidades visitadas.

Tabela 7 - Descrição das comunidades ribeirinhas quanto a região, comunidades e quantidades de amostras

REGIÕES	Nº (COMUNIDADES)	N (AMOSTRAS)	%
Alto Solimões	15	66	15,7
Médio Solimões	8	78	18,5
Baixo Solimões	1	14	3,3
Lago do Mamiá	15	96	22,8
Rio Copeá	26	114	27,1
Lago de Coari	12	51	12,1
Ilha do Ariá	1	1	0,2
Total	78	420	100

Mediante as informações advindas do questionário padrão, estes revelaram que a idade das participantes variou de 18 a 70 anos, com média de idade de 34 anos (DP=12). O grau de escolaridade dessas mulheres foi baixo, onde 49% delas possuem ensino fundamental incompleto, a maioria das mulheres (93,4%) trabalham tendo como principal ocupação a agricultura (90,1%) e 88,1% tinham renda familiar menor que um salário mínimo. A tabela 8 detalha as informações sobre essas variáveis informadas pelas participantes do estudo.

Tabela 8 - Descrição segundo a frequência das variáveis de idades, escolaridade, econômicas e ocupacional das mulheres participantes do estudo

Variáveis (n= 420)	F	%
Idade		
18 --- 25	112	26,6
25 --- 35	127	30,2
35 --- 45	88	20,9
45 --- 55	59	14,9
55 --- 65	32	7,6
≥ 70	2	0,4
Média ± DP		34 ± 12
Amplitude		18 - 70
Escolaridade		
Não escolarizada	30	7,1
Ensino Fundamental incompleto	206	49,0
Ensino Fundamental Completo	93	22,1
Ensino Médio Completo	83	19,7
Ensino Superior Completo	8	1,9
Trabalha		
Sim	392	93,4
Não	28	6,6
Ocupação (n= 392)		
Pescadora	10	2,6
Agricultora	353	90,1
Comerciante	2	0,5
Doméstica	1	0,2
Funcionária Pública	21	5,3
Aposentada	5	1,3

Renda Familiar

Menos de um salário mínimo	370	88,1
Um salário mínimo	43	10,2
Dois Salário mínimo	7	1,7

F= frequência absoluta simples; DP= Desvio padrão.

Quanto ao estado conjugal, o equivalente a 85,3% é casada ou vive em união estável. O número de gestação teve uma mediana de 9 gestações entre as mulheres entrevistadas, a média de idade da primeira gestação das mulheres (n= 404) que tiveram filhos foi de 16,2 (DP= 4,4) anos. Das 420 mulheres, 116 (27,6%) relataram que tiveram abortos espontâneo durante a vida e 80,2% delas tiveram apenas um aborto. Informações elencadas estão detalhadas na tabela 9.

Tabela 9 - Descrição segundo a frequência das variáveis do estado civil e Gestacionais das mulheres participantes do estudo

Variáveis (n= 420)	F	%
Estado Conjugal		
Solteira	42	10
Casada/União estável	358	85,3
Divorciada/Separada/Viúva	20	4,7
Número de Gestação		
Mediana	9	
Amplitude	0 – 20	
Idade da 1° Gestação (n= 404)		
Média ± DP	16,2 ± 4,4	
Amplitude	12 – 32	
Número de Abortos espontâneos (n= 116)		
Um	93	80,2
Dois	15	12,9
Três ou mais	8	6,9

F= frequência absoluta simples

Os dados obtidos quanto ao comportamento sexual das participantes do estudo mostraram que a Média da primeira relação Sexual foi de 15,4 anos (DP= 2,5). Os dados sobre o número de parceiro ao longo da vida das participantes mostraram que a maioria (83,1%) tiveram de 1 a 5 parceiros. Quando questionadas sobre o número de parceiro atualmente, 93,1% responderam que se relaciona apenas com um parceiro, a grande maioria (65,7%) que se relaciona com parceiro fixo relatou que não usam preservativos, por vários motivos elas preferem usar preservativos, principalmente, para evitar gravidez inesperadas. As mulheres que mantêm relações apenas com parceiros eventuais (2,9%), a totalidade faz o uso de preservativo. A tabela 10 detalha o comportamento dessas mulheres estudadas.

Tabela 10 - Descrição quanto a frequência do comportamento sexual das mulheres participantes do estudo

Variáveis (n= Amostras)	F	%
Idade da Primeira relação Sexual		
Média ± DP		15,3 ± 2,5
Amplitude		20
Números de Parceiros ao longo da Vida		
1 a 5	349	83,1
6 a 10	59	14
Acima de 10	12	2,9
Parceria sexual atualmente		
Sem parceiro	24	5,7
Um Parceiro	391	93,1
Mais de 1 Parceiro	1	0,2
Só Parceiro Eventuais	4	1,0
Uso de Preservativo com Parceiro fixo		
Sim	132	31,4
Não	276	65,7
Não tem parceiro fixo	12	2,9
Uso de Preservativo com Parceiro eventuais		

Sim	12	2,9
Não	-	-
Não tem Parceiro eventuais	408	97,1

F= frequência absoluta simples; DP= desvio padrão

Na tabela 11, está elencada as informações das mulheres quanto a presença de algum tipo de infecção por patógenos sexualmente transmissíveis, apenas 4,1% da totalidade das participantes do estudo relatou que tiveram infecções anteriormente.

Tabela 11 - Descrição quanto a frequência de existência de casos de IST nas mulheres participantes do estudo

Variáveis (n= Amostras)	F	%
Já teve alguma IST no passado		
Sim	17	4,1
Não	375	89,2
Nunca fez exame de IST	28	6,7

F= frequência absoluta simples

A maioria das mulheres (n= 314) relataram algum tipo de queixas clínicas, dentre elas, a dor pélvica (61,5%) foi o mais relatado por essas mulheres. Os detalhes estão na tabela 12.

Tabela 12 - Descrição quanto as queixas clínicas das mulheres participantes do estudo

Variáveis (n=Amostras)	F	%
Queixas Clínicas (n= 314)		
Dor pélvica	193	61,5
Corrimento	155	49,4
Disúria	110	35,0
Prurido	110	35,0
Dor após relação sexual	93	29,6
Sangramento após relação sexual	10	3,2
Verrugas genitais	6	1,9

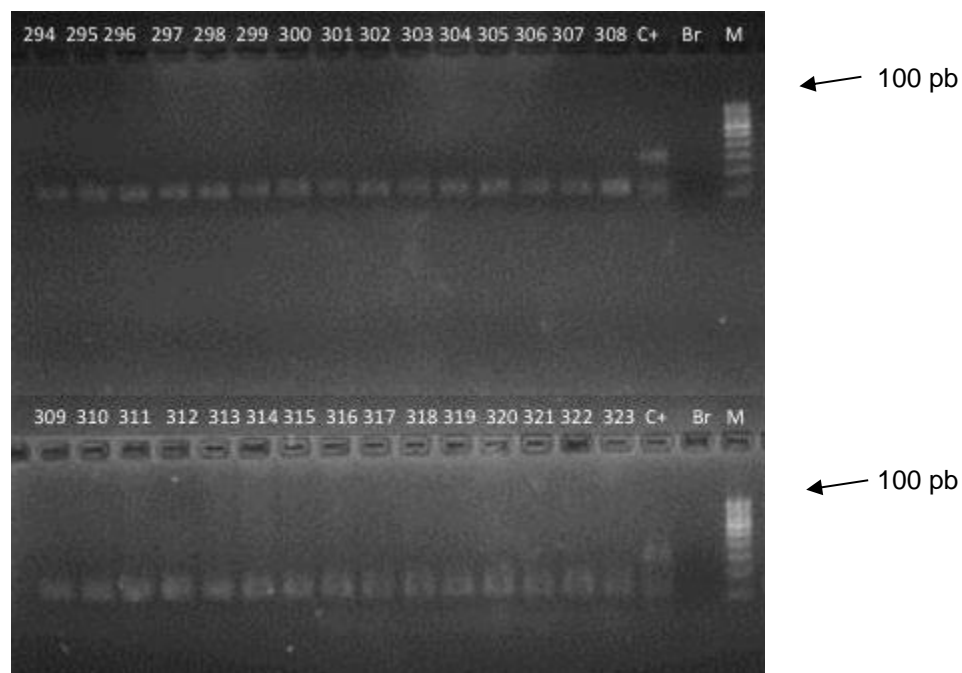
Úlceras genitais	6	1,9
Outras	7	2,2

F= frequência absoluta simples

5.2. Resultados moleculares

As amostras coletadas foram em sua totalidade positivas na primeira PCR para detecção de DNA genômico humano. Portanto, mostrando que a extração de DNA foi realizada com sucesso e que ele está devidamente preservado, conforme mostrado na figura 16.

Figura 16 - Gel de agarose a 1,5%, corado cm brometo de etídeo

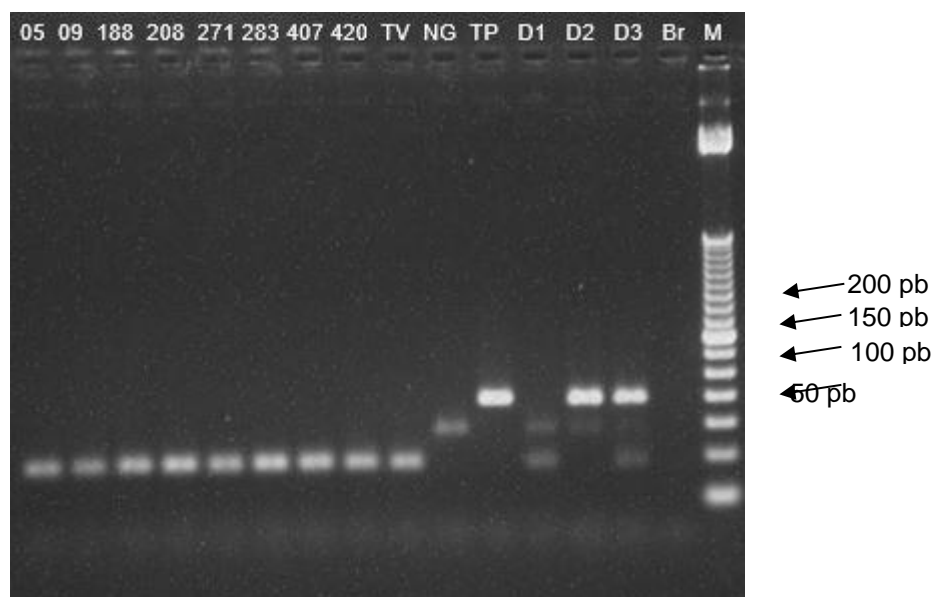


Nota: Confirmação da positividade de DNA genômico humano, usando o par de primers (PCO4/GH20). Br = controle negativo; C+ = Controle positivo; M = Marcador de pares de bases.

A investigação da presença ou ausência dos três referidos patógenos sexualmente transmissíveis através de PCR multiplex convencional, revelou-se que das 420 mulheres arroladas no presente estudo, apenas 8 (1,9%) mulheres estavam infectadas com um único patógeno (*T. vaginalis*) estudado. O DNA dos outros dois patógenos (*N. gonorrhoeae* e *T. pallidum*) não foi encontrado nas amostras.

A detecção do DNA de *T. vaginalis* obtida em 8 amostras cervico-vaginais resultou em uma prevalência de 1,9% na população estudada. A figura 17 ilustra a detecção do patógeno encontrado através da PCR multiplex convencional.

Figura 17 - Gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo



Nota: Confirmação da positividade de DNA de *T. vaginalis* e a ausência de DNA de *N. gonorrhoeae* e *T. pallidum*, usando os três pares de primers (TV01/TV02, NG01/NG02 e TP001/TP002). TV, NG, TP = Controle positivo; Br = controle negativo; D1, D2 e D3 é a mistura dos controles positivos, onde D1 (TV e NG), D2 (NG e TP), D3 (TV, NG e TP); M = Marcador de 50 pares de bases.

5.3. Perfil das mulheres infectadas por *T. vaginalis*

Os dados relativos à infecção por *T. vaginalis* foram cruzadas com os dados sociodemográficos e comportamentais como: idade, escolaridade, ocupação, renda familiar, estado conjugal, dentre outras. Apenas o número de gestações foi estatisticamente significativa, o restante não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre as variáveis e a infecção pelo patógeno em questão. A tabela 13 está a correlação das variáveis das mulheres infectadas com as não infectadas.

Tabela 13 - Associação das variáveis relativas as mulheres infectadas por *T. vaginalis*

Variáveis (n = 420)	<i>T. vaginalis</i>	
	Positivo (8)	Negativo (412)

	F	%	F	%	Total	<i>p-value</i>
Idade						0,115*
Média ± DP	27,7 ± 6,4		34,5 ± 12,1			
Amplitude	19 – 38		18 – 70			
Escolaridade						0,084**
Não escolarizado	1	3,3	29	96,7	30	
Ensino fundamental incompleto	6	2,9	200	97,1	206	
Ensino fundamental completo	1	1,1	92	98,9	93	
Ensino médio completo	----		83	100	83	
Ensino superior completo	----		8	100	8	
Estado Conjugal						****
Solteira/ Divorciada//viúva	5	8,0	57	92,0	62	
Casada/união estável	3	0,8	355	99,1	358	
Número de gestação						0,040***
Mediana	4		4			
Amplitude	1 – 7		0 – 20			
Idade da primeira gestação (n= 404)						0,497*
Média	16,9±1,5		17,6 ± 2,9			
Amplitude	15 – 19		12 – 32			
Número de abortos espontâneos (N=116)						****
Um	2	2,1	91	97,8	93	
Dois	----	----	15	100	15	
Três ou mais	----	----	8	100	8	
Idade da primeira relação sexual						0,652*
Média ± DP	15 ± 1,4		15,4 ± 2,5			
Amplitude	13 – 17		9 – 29			
Números de parceiros ao longo da vida						****
1 a 5	5	1,4	342	98,6	347	

6 a 10	2	3,4	57	96,6	59	
Acima de 10	1	7,1	13	92,9	14	
Parceria sexual atualmente						****
Nenhum	1	4,2	23	95,8	24	
Um parceiro fixo	5	1,3	386	98,7	391	
Mais de um parceiro	----	----	1	100	1	
Só parceiro eventuais	2	50	2	50	4	
Parceiro fixo mais eventuais	----	----	----	----	----	
Uso de preservativo com parceiro fixo						****
Sim	1	0,7	131	99,2	132	
Não	4	1,4	272	98,5	276	
Não tenho parceiro fixo	3	25	9	75	12	
Uso de preservativo com parceiros eventuais						****
Sim	2	16,7	10	83,3	12	
Não	----	----	----	---	----	
Não tenho parceiro eventuais	6	1,5	402	98,5	408	
Já teve alguma IST no passado						
Sim	----	----	17	100	17	****
Não	7	1,9	368	98,1	375	
Nunca fez exame de IST	1	3,6	27	96,4	28	
Queixas clínicas (n= 314)						****
Dor pélvica	3	1,6	190	98,4	193	
Corrimento	5	3,2	150	96,8	155	
Disúria	---	---	110	100	110	
Prurido	2	1,8	108	98,2	110	
Dor após relação sexual	---	---	93	100	93	
Sangramento após relação sexual	2	2,0	8	80	10	
Verrugas genitais	---	---	6	100	6	

Úlceras genitais	---	---	6	100	6
Outras	---	---	7	100	7

DP = Desvio Padrão; n = Número de Amostras; * Teste t-Student; **Teste Exato de Fisher; ***
Teste não paramétrico de Mann-Whitney, ****Não foi possível aplicar a estatística do teste
devido às restrições do Qui-Quadrado

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho trata-se de um estudo epidemiológico de corte transversal, que se avaliou a prevalência de infecção por *T. vaginalis* (tricomoníase), *N. gonorrhoeae* (gonorreia) e *T. pallidum* (Sífilis) em mulheres moradoras da zona rural do município de Coari, no Amazonas. Foram avaliadas 420 amostras vaginais obtidas por autocoleta, através de uma escova que permite a obtenção desse tipo de amostra vaginal, de grande importância para o rastreamento de IST em populações que vivem distantes da zona urbana e assim, acaba deixando de fazer alguns exames de prevenção de suma importância, como o exame de Papanicolau que ajuda na prevenção de câncer de colo do útero causado pelo vírus do HPV e outros patógenos que podem acarretar prejuízos se não diagnosticado e tratado. O mais surpreendente é que o número de casos poderia ser facilmente reduzido ou até eliminado uma vez que a grande maioria desses microrganismos possuem um tratamento fácil e eficaz.

O Amazonas possui um imenso território, segundo dados do IBGE (2019), possui uma população de 4.144.597 habitantes distribuídos nas zonas urbanas e rurais dos seus 62 municípios, apresentando uma grande população ribeirinha vivendo em áreas bastantes remotas e de acesso difícil, onde na maioria dos casos o acesso é unicamente por via fluvial (canoas, barcos e lanchas rápidas), levando horas e até dias para se chegar nos centros urbanos.

Essa pesquisa concentrou-se no município de Coari, localizado na região central do estado do Amazonas. Segundo dados do IBGE 2019, a população de Coari está estimada em 84.272 habitantes, sendo o quinto maior do estado. 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 Petrobrás em suas terras.

Em relação ao desenvolvimento da cidade de Coari com a chegada da Petrobrás, houve um grande fluxo de trabalhadores homens de diferentes regiões do país, na construção do gasoduto Coari-Manaus, tornando um fator relevante para o aparecimento de IST, pois a maioria veio morar em Coari solteiro ou sem a companhia de suas famílias. Estes foram os principais fatores

para a escolha do desenvolvimento do presente estudo no município, tendo em vista também, a existência do Instituto de Saúde e Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (ISB - UFAM), que dispõem de uma estrutura laboratorial para a análise das amostras.

Em relação aos dados epidemiológicos da população em questão, verificou-se alguns parâmetros importantes e que merecem ser destacados, dentre esses, a idade das participantes do presente estudo variou de 18 a 70 anos, com média de idade de 34,5 (DP= 12,2), ou seja, a maioria em idade reprodutiva, baixo grau de escolaridade, pois quase a metade da população apresentava o ensino fundamental incompleto, a maioria possui renda familiar menor que um salário mínimo, cuja a principal ocupação é agricultura (90,1%); quanto ao estado civil, o equivalente a 85,3% é casada ou vive em união estável. Nossos dados, em grande parte se assemelham ao estudo realizado anteriormente no município de Coari por Rocha et al., 2018, visando também investigar a presença de ISTs em mulheres ribeirinhas moradoras da zona rural do município de Coari. O referido estudo investigou 299 mulheres sexualmente ativas e verificou que a idade delas variou entre 18 a 81 anos, com uma média de idade de 35,7 anos (DP \pm 12,8), cerca de 80% das mulheres trabalhavam na agricultura, predominando entre elas uma baixa escolaridade pois, 70% delas relataram menos de oito anos de estudo; a maioria morava com um parceiro (86,6 %). Outro estudo que também corrobora com os dados do presente trabalho, foi feito por Mariño (2015) com 412 mulheres moradoras da zona rural do município de Coari em 2014, mostrando que a idade variou de 18 a 81 anos; também com a maioria casada ou viviam em união estável (84,4%); a média de idade foi 36 anos (DP=13,2), apresentavam uma baixa escolaridade (53,4%), sendo a maioria agricultora (78%), a idade da primeira relação sexual das participantes variou de 11 a 28 anos, com uma média de 16,1 anos, contra 15,4 encontrada em nosso estudo; a maioria também tinha filhos (93,9%), também semelhante ao encontrado em nosso estudo. Portanto, ao analisar os dados das características gerais do presente estudo com o estudo de Rocha et al., 2018 e Mariño, (2015), observamos um perfil em comum entre as participantes.

Ainda em relação ao comportamento sexual das mulheres entrevistadas, a média da primeira relação sexual foi de 15,3 anos (DP= 2,5), sendo que a

maioria (83,1%) tiveram de 1 a 5 parceiros ao longo da vida e atualmente quase a totalidade (93,1%) possuem apenas um parceiro fixo, a mediana da quantidade de gestação das participantes entrevistadas foi de 9 gestação com média de idade de 16,2 (DP= 4,4) anos de idade da primeira gestação entre as entrevistadas, das 420 amostradas, 116 (27,6%) relataram que tiveram abortos espontâneo durante a vida, onde 80,2% teve apenas um aborto, esses dados também assemelha-se ao estudo feito por Rocha (2018), que, a idade da primeira relação sexual foi de 15,2 anos, quanto ao número de parceiros sexuais durante a vida, as mulheres relataram ter tido apenas um (40,1%), o número de gestação foi de quatro ou mais ao longo da vida (68,8%) e noventa e três delas (31,1%) relataram ter sofrido aborto.

O uso de preservativo entre as mulheres estudadas foi observado em apenas 31,4% das mulheres que possuem parceiro fixo, tendo como principal motivo evitar gravidez inesperada e as demais (65,7%) não fazem o uso de preservativo, a maioria relataram se sentirem desconfortáveis, já as mulheres (2,9%) que mantém relações sexuais apenas com parceiros eventuais a totalidade relatou usar preservativo. Observamos então, que o uso de preservativo não tem sido dado a devida importância, uma vez que o uso de camisinha masculina ou feminina durante as práticas sexuais é de extrema importância para evitar a contaminação de patógenos transmissíveis sexualmente, principalmente, quando há relação com múltiplos parceiros (PINTO, 2011; TAMER et al., 2016).

As queixas clínicas foram relatadas por 74,1% das mulheres entrevistadas, muitas delas com mais de um tipo de queixa, sendo a dor pélvica a mais frequente entre as mulheres (61,5%), seguido por: corrimento (49,4%), disúria (35,0%), prurido (35,0%) e outras. Quando comparada com o estudo de Rocha (2018) também com mulheres ribeirinhas, podemos perceber que existe uma leve semelhança desses ocorridos como: dor pélvicas (26,4%), corrimento vaginal (21,0%), prurido e dificuldade em urinar (12,5%). Mediante do questionário padrão também foi possível investigar quanto a presença de algum tipo de IST sofrido por essas mulheres no passado, 4,1% das participantes disseram ter tido.

Conforme descrito anteriormente, esta pesquisa foi realizada com amostras de mulheres sexualmente ativas, objetivando investigar a presença ou

ausência do DNA dos patógenos *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* e *T. pallidum* causadores de IST, em amostras obtidas por autocoleta, usando a técnica de PCR multiplex. De acordo com os resultados obtidos em nossa investigação o único patógeno detectado foi *T. vaginalis* com prevalência de 1,9% não sendo detectado o DNA de *N. gonorrhoeae* e *T. pallidum*. O método mais usado para a pesquisa do *T. vaginalis* ainda é o exame direto a partir de fluido vaginal, ou seja, a visualização do patógeno moveis em lâmina coradas e observadas ao microscópio. Porém, os métodos moleculares têm sido um avanço no diagnóstico de infecções vaginais pois apresentam alto padrão de sensibilidade e especificidade no diagnóstico dessa infecção. A PCR em tempo real, por exemplo, em amostras de raspado endocervical, vaginal e urina apresenta sensibilidade de 92,7 e especificidade de 95%, sendo largamente solicitado em laboratórios como Fleuri e Richet, dentre outros. Em relação a cultura, considerado padrão ouro, a pesquisa de DNA de *T. vaginalis* por PCR tem se mostrado mais sensível do que a cultura, tanto em amostras de fluido vaginal como em urina masculina, (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Trichomoniasis-CDC Fact Sheet. Available from URL: <http://www.cdc.gov/std/trichomonas/stdfact-trichomoniasis.htm>).

6.1. Prevalência de infecção por *T. vaginalis*

A Tricomoníase é uma infecção sexualmente transmissíveis mais prevalente em todo o mundo. Estudos que utilizam métodos moleculares no Brasil para investigar a prevalência de *T. vaginalis* são escassos, o que pode explicar o fato da doença não ser de notificação compulsória, como em muitos países, além disso, porque não causa sequelas graves, muitos clínicos consideram mais um incômodo do que uma ameaça à saúde pública. Porém, vários estudos epidemiológicos relacionam esse patógeno com efeitos adverso que trazem prejuízos, principalmente, para a saúde reprodutiva da mulher como: infertilidade, DIP, parto prematuro, aborto espontâneo, facilita a aquisição e transmissão do vírus do HIV, dentre outros efeitos (COSTA-LIRA et al., 2017; MACIEL; TASCA; CARLI, 2004).

Embora haja a escassez de estudos de prevalência que utilizem métodos moleculares (PCR, PCR em tempo real, mPCR) no Brasil, em estudos

internacionais são frequentemente empregados para determinar a prevalência desse microrganismo (MADICO et al., 1998; HOLLMAN et al., 2010; SCHIRM et al., 2007).

O padrão-ouro para detecção de *T. vaginalis* é a cultura de células. Alguns estudos apontam uma maior sensibilidade dos métodos moleculares em relação à cultura, como o clássico estudo de Madico et al., (1998), ao analisar 350 amostras vaginais, mostrou uma maior detecção por PCR (39%) em relação a cultura (6,6%). O uso de mPCR na detecção de diferentes microrganismos patogênicos incluindo o *T. vaginalis* são frequentemente utilizados, demonstrando alta sensibilidade e especificidade em comparação ao padrão-ouro (GIMENES et al., 2014; SAMRA; ROSENBERG; MADAR-SHAPIRO 2011). A multiplexação possui a vantagem de detectar mais de um patógeno ao mesmo tempo e na mesma amostra. Vários estudos realizados utilizando mPCR para analisar a presença de *T. vaginalis* verificaram diferentes taxas como Kriesel et al., 2016 (3%), Casillas-vega et al., 2016 (14,2%), Rostami et al., 2017 (32,7%). Além de possuir uma alta sensibilidade e especificidade, a mPCR diminui tempo e gastos de reagentes na detecção de vários microrganismos patogênicos de uma mesma amostra.

Em nosso estudo foi identificada a presença de DNA de *T. vaginalis* em 8 escovas cervico-vaginais resultando em uma prevalência de 1,9% na população estudada. Essa prevalência é inferior a encontrada em um estudo feito por Rocha *et al* (2014) que encontrou uma prevalência de 12,7% em mulheres atendidas na atenção primária à saúde, na zona urbana do município de Coari-Am e inferior ainda ao estudo feito por Costa-Lira et al., (2017) realizado na capital do Amazonas (Manaus), que apresentou uma prevalência de 18,04%. Ambos os estudos usaram métodos moleculares de PCR convencional, utilizando os iniciadores BTUB2 e BTUB9.

O trabalho em discussão, utilizou PCR multiplex convencional usando iniciadores (TV01F/TV02R) que amplificam uma região específica de 90 pb do gene beta-tubulina. Esse mesmo gene foi utilizado pelo clássico estudo de Madico et al., (1998), usando os iniciadores BTUB2/BTUB9, que vem sendo empregados em muitos estudos no Brasil (COSTA-LIRA et al., 2017; ROCHA et al., 2014; ROCHA, 2012).

O número de parceiros sexuais, acesso a saúde, baixo nível educacional, iniciação sexual precoce, pobreza, idade, hábitos de higiene, hábitos sexuais, outras ISTs, fase do ciclo menstrual e técnicas de laboratório são os principais fatores de risco citados em estudos epidemiológicos.

No presente estudo observou-se que a maioria das mulheres infectadas por *T. vaginalis* possui uma baixa escolaridade, 2,9% das mulheres têm ensino fundamental incompleto em relação a totalidade com esse nível educacional, as mulheres positivas para esse patógeno apresentaram uma média baixa de idade de 27,75 (DP= 6,4) anos em relação à média de 34,6 (DP= 12,3) anos das não infectadas. Quanto ao estado conjugal das mulheres infectadas, 7,1% eram solteiras em relação as que se encontravam nesse estado civil e 0,8% viviam em união estável ou era casada. Quando analisado o número de parceiros sexuais ao longo da vida, foi observado uma maior prevalência no grupo de mulheres que relatou ter tido de 1 a 5 parceiros (1,4%) ao longo da sua vida sexual em comparação com as não infectadas que tinham a mesma quantidade de parceiros.

Ao analisarmos a idade da primeira relação sexual entre as mulheres infectadas com as não infectadas, observamos uma média de 15 (DP= 1,4) anos e as não infectadas apresentaram média de idade de 15,4 (DP= 2,5) anos, que são bem próximas. A investigação quanto ao uso ou não de preservativo (prevenção primária) entre as mulheres e seus parceiros fixos mostrou que 2,1% não fazem uso de camisinha com seus parceiros em relação as demais que se relacionavam apenas com um parceiro. Das 8 mulheres infectadas, a maioria (n= 7) apresentaram um ou mais tipo de sintomas clínicos, que foram: corrimento vaginal (n= 4), prurido (n= 2), verrugas genitais (n= 1) e Sangramento após relação sexual (n= 2). São sintomas que estão de acordo com os descritos na literatura (BRAVO et al., 2010; ROCHA, 2012).

Uma baixa prevalência de 5,6% por infecção de *T. vaginalis* também foi encontrado no estudo feito por Rocha et al., (2019) com mulheres moradoras de comunidades ribeirinhas do município de Coari/AM, local da coleta das amostras analisadas no presente trabalho, porém em comunidades diferentes. Esse estudo também utilizou a mesmas ferramentas de autocoleta, aliada a PCR convencional para detectar a presença desse protozoário, as variáveis pessoais, clínicas, socioeconômicas e comportamentais das mulheres amostradas se

assemelham com o do presente estudo como: a idade das mulheres variou de 25 a 70 anos, com média de idade de 35,8 (DP= 13,7), apresentando um grau de escolaridade baixa, onde 74,7% tinha apenas 8 anos ou menos de estudo, sendo a maioria (85,3%) casadas ou vivendo em união estável, a maioria (95,3%) das mulheres possuíam uma renda familiar menor que um salário mínimo, tendo como principal ocupação a agricultura (77,3%), quanto ao estado conjugal, o equivalente a 85,3% eram casadas ou viviam em união estável. Essas variáveis corroboram com o trabalho em discussão diante da prevalência encontrada pois, as amostras foram autocoletadas de uma população parecidas do nosso estudo.

A epidemiologia da tricomoníase pode esta subestimada pois, é uma infecção não reportada e por apresentar muitos casos assintomáticos. Nos Estados Unidos, a tricomoníase está entre as cinco principais infecções parasitárias descritas como negligenciadas (COLEMAN; GAYDOS; WITTER, 2013). No Brasil, a prevalência é estimada a partir de estudos locais já que não é de notificação compulsória, fazendo necessário mais estudo nacional para entender a relevância epidemiológica dos casos de tricomoníase no país. A prevalência apontada pelos estudos é variável, que está implicado nas características como o tipo do estudo, métodos de diagnósticos empregado, escolaridade, idade, acesso a saúde e outros fatores que são apontados como relevantes em pessoas positivas para a presença de *T. vaginalis* (AMBROZIO et al., 2016).

Em populações de baixo risco a prevalência é menor que 3,5%, por outro lado, em clínicas de IST e populações específicas, a prevalência pode variar entre 4,8% e 25%, dependendo da população envolvida no estudo (PIPERAKI et al., 2010). O baixo número de caso de tricomoníase foi discutido por Adad et al., (2001), mostrando que houve uma diminuição desse protozoário a partir dos anos 90, mencionando a eficácia do metronidazol no tratamento dessa infecção e as condições de higiene, destacando também a conscientização da prevenção das IST, principalmente devido o advento da AIDS, uma vez que há a associação de tricomoníase com a aquisição e transmissão do HIV.

O primeiro estudo de prevalência de IST utilizando testes moleculares em amostras autocoletadas em comparação com amostras coletadas por médico na região do Tapajós no Amazonas feito por Rodrigues et al., (2019), em

uma população de mulheres não infectadas e infectadas pelo vírus do HIV, mostrou que houve concordância dos resultados entre o tipo de amostragem, considerando o número total das mulheres positivas para *T. vaginalis* em pelo menos um tipo de amostra foi de 9,8% (4/41) nas mulheres infectadas e 0,9% (1/112) das não infectadas pelo HIV. Outro estudo feito por Silva et al., 2013, avaliando população vivendo com HIV, apontou uma prevalência de 4,1% para *T. vaginalis* no estado do Amazonas. Através desses estudos, podemos observar uma maior quantidade de casos entre as mulheres infectadas com o vírus do HIV, reforçando a relação desse protozoário com a transmissão e aquisição do HIV, e quanto ao tipo de amostra não houve uma grande diferença nos resultados.

Embora a infecção por *t. vaginalis* seja uma infecção de fácil tratamento, estudos associam esse patógeno com complicações de saúde, despertando uma preocupação para esses agravos que acarreta um maior gasto com tratamentos (SECOR et al., 2014). Portanto, as estimativas da epidemiologia reforçam a necessidade de intervenções efetivas de saúde pública para prevenção primária, diagnóstico, tratamento e métodos de rastreios, possibilitando uma maior cobertura das ISTs (NEWMAN et al., 2015).

Ao analisarmos os dados sociodemográficos e comportamentais das mulheres amostradas positivas para o *T. vaginalis*, tais como o estado civil, números de parceiros ao longo da vida, idade, escolaridade, número de filhos e o uso de preservativos, para investigar a associação com o protozoário (tabela 17), não houve diferença estatisticamente significativa na maioria das variáveis entre os dois grupos. Embora a correlação entre as variáveis de amostras positivas e negativas e a presença do *T. vaginalis* não ter mostrado diferença estatisticamente significativa, mas podemos observar que uma prevalência maior, nos casos positivos para *T. vaginalis*, nas mulheres com ensino fundamental incompleto (2,9%), solteiras/divorciadas/viúvas (8,0%), que tiveram 1 a 5 parceiros ao longo da vida (1,4%), e as que não faziam uso de preservativo com parceiros fixos (1,4%). Por outro lado, apenas o número de gestação foi estatisticamente significativo ($p= 0,040$), para a associação com o *T. vaginalis*, diante do nível de significância (5%) e intervalo de confiança (95%) aplicado nos testes.

A OMS estima que a prevalência de tricomoníase no mundo é de 143 milhões de casos entre mulheres e homens com idades entre 15 a 49 anos. No Brasil, a prevalência da tricomoníase varia entre 1,9% e 37,5%, dependendo das técnicas utilizadas no diagnóstico, bem como da população estudada, idade, escolaridade e outros. As populações de baixo risco a prevalência são menores que 3,5%, por outro lado, em clínicas de ISTs e populações específicas, a prevalência pode variar entre 4,8% e 25%. Portanto, diante da prevalência encontrada nesse estudo (1,9%), concluímos que a população envolvida no estudo é de baixo risco para *T. vaginalis*, mas que precisa de mais estudos para melhor avaliar a prevalência desse protozoário e assim implementar um rastreamento para continuar a investigação dessas mulheres que muitas das vezes são subdiagnosticada e levar a equidade do sistema de saúde pública.

6.2. Prevalência de infecção por *N. gonorrhoeae*

A identificação dos casos de infecção por *N. gonorrhoeae*, a notificação e o tratamento dos parceiros sexuais são de grande importância para a intervenção de novos casos de gonorreia (CHOUHURY et al., 2006).

O presente estudo também investigou a presença da bactéria *N. gonorrhoeae*. O DNA dessa bactéria não foi encontrado em nenhuma das amostras. A investigação da presença do DNA gonocócico foi realizada usando os iniciadores NG01F e NG02R, cujo alvo desses *primers* é o pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae*, que codifica proteínas de membranas de grande importância para a célula. Iniciadores que delimitam uma região do pseudogene *porA* vem sendo frequentemente usado em estudos de prevalência no Brasil e no mundo (ROCHA, 2012; LIRA, 2017; SANTOS, 2014; LIU et al, 2017; HJELMEVOLL, et al., 2006). Este gene é expresso apenas nas *N. meningitidis* e *N. gonorrhoeae*, apesar desse gene possuir regiões homólogas, os iniciadores são desenhados em regiões específicas não homólogas (WHILEY et al., 2004).

Os principais fatores de riscos para adquirir *N. gonorrhoeae* apontados em estudos de prevalência são: idade, número de parceiros sexuais, idade precoce da primeira relação sexual, troca de parceiros, o uso infrequente de preservativo, principalmente, quando se relacionam com múltiplos parceiros eventuais pois, a camisinha masculina ou feminina é o método de prevenção

primária para todos os tipos de IST, entre outros fatores de riscos descritos na literatura (PIAZZETTA et al., 2011).

A baixa prevalência encontrada em trabalhos utilizando métodos moleculares são bastante frequentes em estudos epidemiológicos no mundo todo. Em outros países, as baixas taxas foram verificadas em alguns estudos como Taffa et al., 2002 (1,0%), Paz-Bailey et al., 2002 (0,4%), Asbel et al., 2006 (0,8%). No Brasil, as baixas taxas também foram encontradas por Rocha et al., 2014 (1,4%), Miranda et al., 2017 (0,9%), Britto et al., 2018 (1,8%), Codes et al., 2002 (0,5%), Ramos et al., 2003 (0,6%). Alguns aspectos podem justificar essa quantidade pequena de casos de infecção por *N. gonorrhoeae*, dentre elas, a idade dos pacientes envolvidas nos estudos, uma vez que os adolescentes são mais vulneráveis as IST.

Embora a maioria dos estudos que usam métodos moleculares para detecção de *N. gonorrhoeae* utilizam PCR convencional, muitos deles empregam mPCR, apresentando uma alta sensibilidade e especificidade na detecção dessa bactéria e demais patógenos sexualmente transmissíveis envolvidos na mesma reação, como o estudo de Rostami et al., 2017 (5,7%), Krisel et al., 2015 (7%), Gimenes et al., 2014 (4%), Casillas-Vega et al., 2016 (2,11%). A mPCR além de possuir uma alta sensibilidade e especificidade na detecção de patógenos sexualmente transmissíveis, também diminui tempo na execução da técnica e gastos de reagentes.

Os estudos que visam identificar a bactéria *N. gonorrhoeae* e não detectam a presença de DNA gonocócico em suas amostras, pode ser explicado pelo fato das características da população estudada, se apresentam ou não alguns dos fatores de risco da gonorreia. Também, podemos destacar que apesar de apresentar alguns casos assintomáticos, a infecção por *N. gonorrhoeae* apresenta quase sempre sintomas bastantes incômodos como corrimento vaginal e prurido, essa presença de sintomas agudo faz com que o indivíduo infectado procure imediatamente o serviço de saúde (NG, MARTIN, 2005; SCHIELKE, FROSCH, KURZAI, 2010).

Uma baixa prevalência de casos de gonorreia foi encontrada no estudo feito por Rodrigues et al., (2019), ao comparar amostras autocoletadas e coletadas por médico de mulheres infectadas e não infectadas com o vírus de HIV, na região do Tapajós no Amazonas, apresentando uma concordância dos

resultados entre o tipo de amostragem, levando em consideração o número total das mulheres positivas para *N. gonorrhoeae* em pelo menos um tipo de amostra foi de 4,9% (2/41) nas mulheres infectadas e 2,7% (3/112) das não infectadas pelo HIV. Através desse estudo comparativo sobre o tipo da coleta das amostras, observamos que a detecção de patógenos sexualmente transmissíveis pode ser feito sem nenhuma alteração no resultado.

Estudo feito por Lira (2017), analisando 187 amostras cervicais coletadas de mulheres na cidade de Manaus/Am, não encontrou a presença de DNA gonocócico em nenhuma das amostras. A investigação foi feita através de métodos moleculares (PCR), usando os iniciadores PapF e PapR, que tem como alvo o pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae*, as amostras foram coletadas com o auxílio de espéculos, a idade das mulheres envolvidas no estudo variou de 16 a 50 anos e a maioria afirmaram está casada ou em uma união estável. O estado civil e a idade dessas mulheres se assemelham com o presente estudo pois, a idade da presente população envolvidas no estudo variou entre 18 e 70 anos, com média de idade de 34 (DP= 12), e a maioria (85,3%) das mulheres eram casadas ou viviam em união estável.

O presente trabalho apresentou algumas limitações que incluem o tamanho da amostra e o delineamento do estudo, pois os estudos transversais não são os mais adequados para a investigação de fatores de riscos. Também temos que levar em consideração a exatidão das respostas obtidas no questionário, uma vez que as entrevistadas podem ter omitido dados comportamentais em função de constrangimento. Diante desses achados, há a necessidade de um rastreamento para essa infecção em mulheres que vivem em áreas remotas e tem o acesso dificultado a saúde pública (MACHADO FILHO et al., 2010). Portanto, diante da população estudada, das limitações do estudo, dos fatores de riscos e da sintomatologia grave que a presença da bactéria evoca, podemos justificar a não detecção de DNA gonocócico em nossas amostras.

6.3. Prevalência de infecção por *T. pallidum*

O diagnóstico da sífilis é realizado de acordo com o estágio da infecção. O *T. pallidum* não pode ser cultivável em meios de cultura. Existem vários

métodos de diagnósticos para detectar a presença de espiroquetas, dentre estes, os métodos moleculares (PCR, PCR em tempo real, mPCR). No início dos anos 90 a PCR passou a ser empregada para avaliar a presença de DNA treponêmico, apresentando alta sensibilidade e especificidades (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006).

A investigação das 420 amostras para detecção de *T. pallidum* foi feita utilizando os iniciadores TP001F e TP002R que amplificam uma sequência de 194 pb do gene *polA*. O produto desse gene é a proteína DNA polimerase I, envolvida no reparo de DNA e na replicação do material genético de diferentes organismos, para o *T. pallidum* esse gene possui uma sequência específica. O desenho de *primers* visando amplificar uma sequência específica do gene *polA* de *T. pallidum* vem sendo frequentemente usado em muitos estudos de prevalência (CAVALCANTE et al., 2019; HEYMANS et al., 2010; GAMA et al., 2017).

A presença de DNA da bactéria *T. pallidum* não foi encontrada em nenhuma das amostras analisadas. Diferentes estudos que visam estimar a prevalência de sífilis apontam alguns fatores de riscos associado a aquisição do *T. pallidum*. Para mulheres de idade fértil e gestantes são: idade, pobreza, múltiplos parceiros sexuais, falta de acesso a saúde, baixo nível educacional, uso de drogas entre outros. Em relação a sífilis congênitas são: falta de assistência ao pré-natal, gestantes com parceiros eventuais, tratamento inadequado entre outros (DOMINGUES; LEAL, 2016; GUINSBURG; SANTOS, 2010).

Os métodos de detecção direta (Microscopia, PCR, mPCR) para detectar *T. pallidum* são frequentemente utilizados em estudos de prevalência de sífilis. A detecção dessa bactéria através de mPCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, assim como para os demais patógenos sexualmente transmissíveis. Estudos que usam mPCR verifica diferentes taxas de detecção dessa bactéria, como o de Casilhas-veja et al., 2016 (1,05%), Krisel et al., 2015 (4%), Gimenes et al., 2014 (5,3%). A mPCR além de apresentar uma alta sensibilidade e especificidade na detecção de patógenos sexualmente transmissíveis, também diminui tempo na execução da técnica e gastos de reagentes.

A sífilis é considerada uma infecção sistêmica, pois a bactéria entra na corrente sanguínea logo após o desfecho do estágio inicial da infecção. Então, temos que levar em consideração o estágio (sífilis primária, secundária e terciária) da infecção e o tipo da amostra coletada para ser analisada quanto a presença de DNA treponêmico. A sífilis primária apresenta-se como uma ulceração no local da entrada da bactéria. No segundo estágio da sífilis o treponema já está na corrente sanguínea, mas pode caracterizar-se por um exantema maculopapular disseminado (região palmar e plantar) (AVELLEIRA; BOTTINO, 2006). Portanto, apenas o estágio primário e secundário vai apresentar sintomas com a presença da bactéria no local da infecção, que se torna essencial para investigação através dos métodos de detecção direta (Microscopia, imunofluorescência e PCR) (PEELING et al., 2017).

A investigação da presença de DNA treponêmico foi realizado em amostras cervico-vaginal autocoletada. Considerando o tipo da amostra, apenas sífilis no estágio primário poderia ser encontrado, pois o treponema fica retido na úlcera e conseqüentemente nas membranas da mucosa, então facilmente durante o processo de autocoleta seria possível a coleta da bactéria, mas o treponema permanece apenas entre 2 a 8 dias no local da penetração. O presente trabalho apresentou algumas limitações como: o tamanho da amostra e o delineamento do estudo, pois os estudos transversais não são os mais adequados para a investigação de fatores de riscos. Também temos que levar em consideração a exatidão das respostas obtidas no questionário, uma vez que as entrevistadas podem ter omitidos dados comportamentais em função de constrangimento. Os achados do presente estudo reforçam a necessidade de um rastreamento para a sífilis em mulheres que tem o acesso dificultado a saúde pública, como as mulheres ribeirinhas que vivem em áreas remotas (MACHADO FILHO et al., 2010). Diante desse contexto de fatores de riscos, limitações do estudo, população estudada e estágios da infecção, podemos justificar o fato de não encontrar a bactéria *T. pallidum* em nosso estudo.

7. CONCLUSÕES

Diante dos objetivos propostos e dos resultados alcançados, podemos concluir que:

- Mediante pesquisa de DNA dos patógenos *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* e *T. pallidum* em amostras cervico-vaginais obtidas por autocoleta de mulheres ribeirinhas do município de Coari usando a PCR Multiplex obteve-se prevalência 1,9% do protozoário *T.vaginalis* nas amostras investigadas;
- Não foi detectado o DNA de *N. gonorrhoeae* e *T. pallidum* em nenhuma das amostras analisadas;
- Não foi possível identificar o perfil epidemiológico e de risco das mulheres infectadas com os referidos patógenos;
- Os iniciadores específicos desenhados para o estudo mostram-se eficientes para detecção dos três referidos patógenos pesquisados;
- As estimativas da prevalência de IST são essenciais para os esforços de prevenção e controle;
- A autocoleta de amostras cervico-vaginal aliado aos métodos moleculares (PCR multiplex) se mostrou uma ferramenta útil para o rastreamento de IST.

7.1. Considerações finais:

O conhecimento da situação epidemiológica de *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* e *T. pallidum* gerada por esse trabalho poderá servir de base para a implementação de tratamento e de estratégias de rastreamento desses patógenos na região; São necessários outros estudos para avaliar os fatores de riscos nesta população e possível associação à infecção causados pelos três patógenos estudados.

8. REFERENCIAS

ABRAMS, A. J.; TREES, D. L.; NICHOLAS, R. A. Complete genome sequences of three *Neisseria gonorrhoeae* laboratory reference strains, determined using PacBio single-molecule real-time technology. **Genome Announc**, v. 3, n. 5, p. 1-2, 2015.

VENCESLAU, E. M.; BEZERRA, M. M.; LOPES, A. C. M.; SOUZA, É. V.; ONOFRE, A. S. C.; MELO, C. M.; JERALDO, V. L. S.; ONOFRE, F. B. M. HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, v. 50, p. 280-285, 2014.

ADAD, S. J.; LIMA, R. V.; SAWAN, Z. T. E.; SILVA, M. L. G.; SOUZA, M. A. H.; SALDANHA, J. C.; FALCO, V. A. A.; CUNHA, A. H.; MURTA, E. F. C. Frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Candida* sp and *Gardnerella vaginalis* in cervical-vaginal smears in four different decades. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 119, n. 6, p. 200-205, 2001.

ALMEIDA-LUGO, L. Z.; BONIN-JACOB, C. M.; DE MATOS, V. T. G.; TOZETTI, I. A. Self-Collection and Molecular Diagnosis for Detection of Human Papillomavirus: Why Incorporate It?. **Current infectious disease reports**, v. 21, n. 4, p. 13, 2019.

AMBROZIO, C. L.; NAGEL, A. S.; JESKE, S.; BRAGANÇA, G. C. M.; BORSUK, S.; VILLELA, M. M. *Trichomonas vaginalis* prevalence and risk factors for women in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

ARROYO, R.; ALDERETE, J. F. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 57, n. 10, p. 2991-2997, 1989.

ASBEL, L. E.; Newbern, E. C.; Salmon, M.; Spain, C. V.; Goldberg, M. School-based screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* among Philadelphia public high school students. **Sexually transmitted diseases**, v. 33, n. 10, p. 614-620, 2006.

AVELLEIRA, J. C. R.; BOTTINO, G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle Syphilis: diagnosis, treatment and control. **An Bras Dermatol**, v. 81, n. 2, p. 111-26, 2006.

BARBOSA, B.; K. F.; BATISTA, A. P.; NACIFE, M. B. P. S. L.; VIANNA, V. N.; OLIVEIRA, W. W. D.; MACHADO, E. L.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Fatores associados ao não uso de preservativo e prevalência de HIV, hepatites virais B e C e sífilis: estudo transversal em comunidades rurais de Ouro Preto, Minas Gerais, entre 2014 e 2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 28, p. e2018408, 2019.

BARCELOS, M. R. B.; VARGAS, P. R. M. D.; 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, p. 349-54, 2008.

BAZZO, M. L.; GOLFETTO, L.; GASPAR, P. C.; PIRES, A. F.; RAMOS, M. C.; FRANCHINI, M.; FERREIRA, W. A.; UNEMO, M.; BENZAKEN, A. S. First nationwide antimicrobial susceptibility surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* in Brazil, 2015–16. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 7, p. 1854-1861, 2018.

BENZAKEN, A. S.; GARCIA, E. G.; SARDINHA, J. C. G.; PEDROSA, V. L.; LOBLEIN, O. Baixa prevalência de DST em profissionais do sexo no município de Manacapuru–interior do Estado do Amazonas, Brasil. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 14, n. 4, p. 9-12, 2002.

BENZAKEN, A.; SALES, D.; JUNIOR, J. P.; PEDROSA, V. L.; GARCÍA, E. G. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em mulheres atendidas na clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Amazonas. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, n. 3, p. 129-34, 2010.

BERMAN, S. M. Maternal syphilis: pathophysiology and treatment. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, p. 433-438, 2004.

BERMINGHAM, N.; LUETTICH, K. Polymerase chain reaction and its applications. **Current diagnostic pathology**, v. 9, n. 3, p. 159-164, 2003.

BOUCHEMAL, K.; BORIES, C.; LOISEAUB, P. M. Strategies for prevention and treatment of *Trichomonas vaginalis* infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 3, p. 811-825, 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: infecções sexualmente transmissíveis. Relatório de recomendação. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Sífilis 2018. Brasil, v. 49, n. 45, p. 1-41, 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/novembro/13/BE-2017-038-Boletim-Sifilis-11-2017-publicacao-.pdf>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Sífilis 2018. Brasil, v. 49, n. 45, p. 1-41, 2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/wp-content/uploads/2018/11/boletim-sifilis-2018-brasil-1.pdf>.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: Sífilis 2019. Brasil, v. 01, n. especial, p. 1-49, 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/outubro/30/Boletim-Sifilis-2019-internet.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. DataSUS, 2018.

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.

BRAVO R. S.; GIRALDO, P. C.; CARVALHO, N. S.; GABIATTI J.R.E.; VAL, I.C.C.; GIRALDO, H.P.D.; PASSOS, M.D.L. Tricomoniase Vaginal: o que se Passa? **DST J Bras Doenças Sex Transm**, v. 22, p. 73-80, 2010.

BRITTO, A. M. A.; POLICARPO, C.; PEZZUTO, P.; MEIRELLES, A. R. I.; FURTADO, Y. L.; ALMEIDA, G.; OLIVEIRA, G.; PONTES, E. D.; LIMA, F. R. S.; SOARES, M. A.; AGUIAR, R. S.; TANURI, A.; GIANNINI, A. L.; MACHADO, L. S. Detection of sexually transmitted infections at a Brazilian gynecology center: high prevalence of co-infections. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 54, n. 6, p. 393-400, 2018.

BROWN, H. L.; FULLER, D. D.; JASPER, L. T.; DAVIS, T. E.; WRIGHT, J. D. Clinical Evaluation of Affirm VPIII in the Detection and Identification of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, and *Candida* Species in Vaginitis/Vaginosis. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 12, n. 1, p. 17-21, 2004.

BRUNI, Mirian Pinheiro et al. *Trichomonas vaginalis* and HIV infection: relation and prevalence among women in southern Brazil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 48, n. 1, p. 15-24, 2019.

CAMPOS, E.; GARCIA, O. E. G.; BARBOSA, M. J. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Rev bras ginecol obstet**, v. 30, n. 12, p. 614-9, 2008.

CARLTON, J. M. et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science**, v. 315, n. 5809, p. 207-212, 2007.

CASAL, C. A. D.; SILVA, M. O. D.; COSTA, I. B.; ARAÚJO, E. D. C.; CORVELO, T. C. D. O. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. *pallidum* in blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: a retrospective observational study in northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p. 451-456, 2011.

CASILLAS-VEGA, N.; MORFÍN-OTERO, R.; GARCÍA, S.; LLACA-DÍAZ, J.; RODRÍGUEZ-NORIEGA, E.; CAMACHO-ORTIZ, A.; MALDONADO-GARZA, H. J. Sexually transmitted pathogens, coinfections and risk factors in patients attending obstetrics and gynecology clinics in Jalisco, Mexico. **salud pública de méxico**, v. 58, n. 4, p. 437-445, 2016.

CAVALCANTE, N. D. S.; LIMA, H. R. R. D.; TABOSA, D. F.; BARBOSA, E. D. S. S.; COSTA, N. P. D. S.; COSTA, L. M. D.; *FRADE, P. C. R.; MARTINS, L. C.; SILVA-OLIVEIRA, G. C.*; OLIVEIRA-FILHO, A. B. D. Syphilis in female sex workers: an epidemiological study of the highway system of the state of Pará, northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDCP). Sexually Transmitted Infections in Developing Countries. **Current concepts and strategies on improving STI prevention, treatment, and control**, 2008. Disponível em: https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=Sexually+Transmitted+Infections+In+Developing+Countries&btnG= Acessado em 20/06/2019.

CERQUEIRA, L. R. P. D.; MONTEIRO, D. L.; TAQUETTE, S. R.; RODRIGUES, N. C.; TRAJANO, A. J.; SOUZA, F. M. D.; ARAÚJO, B. D. M. The magnitude of syphilis: from prevalence to vertical transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p. 1-7, 2017.

CHARLTON, O. A.; PURI, P.; DAVEY, L.; WEATHERALL, C.; KONECNY, P. Rapid progression to gummatous tertiary syphilis in a patient with HIV. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 60, n. 1, p. 48-50, 2019.

CHEMAITELLY, H.; HARFOUCHE, M.; BLONDEEL, K.; MATSASENG, T. C.; KIARIE, J.; TOSKIN, I.; ABU-RADDAD, L. J. Global epidemiology of Neisseria gonorrhoeae in infertile populations: protocol for a systematic review. **BMJ open**, v. 9, n. 5, p. 1-6, 2019.

CHEON, S. H.; KIM, S. R.; SONG, H. O.; AHN, M. H.; RYU, J. S. The dimension of Trichomonas vaginalis as measured by scanning electron microscopy. **The Korean journal of parasitology**, v. 51, n. 2, p. 243, 2013.

CHESSON, H. W.; HEFFELFINGER, J. D.; VOIGT, R. F.; COLLINS, D. Estimates of primary and secondary syphilis rates in persons with HIV in the United States, 2002. **Sexually transmitted diseases**, v. 32, n. 5, p. 265-269, 2005.

CHOUDHURY, B.; RISLEY, C. L.; GHANI, A. C.; BISHOP, C. J.; WARD, H.; FENTON, K. A.; SPRATT, B. G. Identification of individuals with gonorrhoea within sexual networks: a population-based study. **The Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 139-146, 2006.

CHUGH, T. D.; GAIND, R. Sexually transmitted infections. **Clinics in laboratory medicine**, v. 32, n. 2, p. 143-158, 2012.

CODES, José Santiago de et al. Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em clínica de planejamento familiar da rede pública no Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, p. 101-106, 2002.

COLEMAN, J. S.; GAYDOS, CHARLOTTE A.; WITTER, F. Trichomonas vaginalis vaginitis in obstetrics and gynecology practice: new concepts and controversies. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 68, n. 1, p. 43, 2013.

COSTA-LIRA, E.; JACINTO, A. H. V. L.; SILVA, L. M.; NAPOLEÃO, P. F. R.; BARBOSA-FILHO, R. A. A.; CRUZ, G. J. S.; ASTOLFI-FILHO, S.; BORBOREMA-SANTOS, C. M. et al. Prevalence of human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, and Trichomonas vaginalis infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology. **Genet Mol Res Genet Mol Res**. <https://doi.org/10.4238/gmr16029626>, 2017.

DARLIN, L.; BORGFELDT, C.; FORSLUND, O.; HÉNIC, E.; DILLNER, J.; KANNISTO, P. Vaginal self-sampling without preservative for human papillomavirus testing shows good sensitivity. **Journal of Clinical Virology**, v. 56, n. 1, p. 52-56, 2013.

DAUGHERTY, M.; GLYNN, K.; BYLER, T. Prevalence of Trichomonas vaginalis Infection Among US Males, 2013–2016. **Clinical Infectious Diseases**, v. 68, n. 3, p. 460-465, 2018.

DE LEMOS, P. A. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Aspects of trichomonas vaginalis' infection and diagnostic methods Aspectos relacionados com a infecção por trichomonas vaginalis e diagnóstico laboratorial. **Acta Obstet Ginecol Port**, v. 8, n. 2, p. 152-162, 2014.

LIMA, Morgana Cristina Leôncio de et al. Prevalência e fatores de risco independentes à tricomoníase em mulheres assistidas na atenção básica. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 26, p. 331-337, 2013.

DIAMANTIS, A.; MAGIORKINIS, E.; ANDROUTSOS, G. Alfred François Donné (1801-78): a pioneer of microscopy, microbiology and haematology. **Journal of medical biography**, v. 17, n. 2, p. 81-87, 2009.

DJOKIC, V.; GIACANI, L.; PARVEEN, N. Analysis of host cell binding specificity mediated by the Tp0136 adhesin of the syphilis agent Treponema pallidum subsp. pallidum. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 5, p. 1-19, 2019.

DOMINGUES, R. M. S. M.; LEAL, M. C. Incidência de sífilis congênita e fatores associados à transmissão vertical da sífilis: dados do estudo Nascer no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, p. e00082415, 2016.

DONATI, L.; DI VICO, A.; NUCCI, M.; QUAGLIOZZI, L.; SPAGNUOLO, T.; LABIANCA, A.; BRACAGLIA, M.; IANNIELLO, F.; CARUSO, A.; PARADISI, G. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 281, n. 4, p. 589-600, 2010.

DUARTE, G.; COSENTINO, L. A.; GUPTA, P.; MIETZNER, T.; LANDERS, D. V. Aumento da replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 induzida por Neisseria gonorrhoeae na presença de leucócitos polimorfonucleares. **DST-Jornal Brasileiro de Doenças sexualmente transmissíveis**, v. 15, n. 3, p. 5-9, 2003.

EDWARDS, J. L.; APICELLA, M. A. The molecular mechanisms used by Neisseria gonorrhoeae to initiate infection differ between men and women. **Clinical microbiology reviews**, v. 17, n. 4, p. 965-981, 2004.

ESCHENBACH, D. A.; PATTON, D. L.; HOOTON, T. M.; MEIER, A. S.; STAPLETON, A.; AURA, J.; AGNEW, K. Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, n. 6, p. 913-918, 2001.

FEITTOSA, C. F.; CONSOLARO, M. E. L. Tricomoníase: aspectos gerais e diagnóstico pela colpocitologia de papanicolaou. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 9, n. 3, 2008.

FERNANDES, M. A.; BEZERRA, M. M.; PIRES, F. M. D. J. S.; ALENCAR, N. E. S.; LIMA, F. F. F.; CASTRO, A. E. D. Infecções sexualmente transmissíveis e as vivências de mulheres em situação de reclusão [Sexually transmitted infections and the experiences of women in situations of imprisonment]. **Revista Enfermagem UERJ**, v. 24, n. 6, p. 1-6, 2016.

FERNANDES, T.; BORTOLOZZI, F.; NOGUEIRA, K.; MARCONI, C.; MONTEIRO C. L. N. gonorrhoeae no Brasil e no mundo. **Femina**, v. 46, n. 2, p. 76-89, 2018. Disponível em: <https://www.febrasgo.org.br/media/k2/attachments/34Z-ZVolZ46Z-Zn2-Z2018.pdf>. Acessado em 09/07/2019.

FERREIRA, W. A.; VASCONCELOS, W. S., GOMES, J. S.; SILVA, M. F. P., FERREIRA, C. M. *Susceptibility of neisseria gonorrhoeae to gentamicin, chloramphenicol and other antibiotics in Manaus, Amazon, Brazil* **DST - J bras Doenças Sex Transm**, v. 27, v. 1-2, p. 58-60, 2015.

FIGUEROA-ANGULO, E. E. et al. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. **Microbes and infection**, v. 14, n. 15, p. 1411-1427, 2012.

FRASER, CLAIRE M. et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 375-388, 1998.

FREDLUND, H. A. N. S.; FALK, L. A. R. S.; JURSTRAND, M.; UNEMO, M. Molecular genetic methods for diagnosis and characterisation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions. **Apmis**, v. 112, n. 11-12, p. 771-784, 2004.

GAMA, A., CARRILLO-CASAS, E. M.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; VÁZQUEZ-ACEITUNO, V. A.; TOUSSAINT-CAIRE, S.; XICOHTENCATL-CORTES, J.; MORENO-COUTIÑO, G. *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* identification by real-time PCR targeting the *polA* gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. **International journal of STD & AIDS**, v. 28, n. 13, p. 1299-1304, 2017.

GATTI, F. A.; CEOLAN, E.; GRECO, F. S. R.; SANTOS, P. C.; KLAFKE, G. B.; DE OLIVEIRA, G. R.; SCAINI, C. J. The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil. **PloS one**, v. 12, n. 3, p. e0173604, 2017.

GERBASE, A. C.; ROWLEY, J. T.; MERTENS, T. E. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. **The lancet**, v. 351, p. S2-S4, 1998.

GEVELBER, M. A.; BIRO, F. M. Adolescentes e doenças sexualmente transmissíveis. **Clin Pediatr Am Norte**, v. 49, p. 751-772, 1999.

GIMENES, F.; MEDINA, F. S.; DE ABREU, A. L. P.; IRIE, M. M. T.; ESQUIÇATI, I. B.; MALAGUTTI, N.; VASCONCELLOS, V. R. B.; DISCACCIATI, M. G.; BONINI, M. G.; MARIA-ENGLER, S. S.; CONSOLARO, M. E. L. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. **PloS one**, v. 9, n. 6, 2014.

GOMES, N. C. R. C.; MEIER, D. A. P.; PIERI, F. M.; ALVES, E.; ALBANESE, S. P. R.; LENTINE, E. C.; ARCÊNCIO, R. A.; DESSUNTI, E. M. Prevalence and factors associated with syphilis in a reference center. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p. 27-34, 2017.

GOPALKRISHNA, V.; AGGARWAL, N.; MALHOTRA, V. L.; KORANNE, R. V.; MOHAN, V. P.; MITTAL, A. D. B. C.; DAS, B. C. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. **Clinical microbiology and infection**, v. 6, n. 2, p. 88-93, 2000.

GUINSBURG, R.; SANTOS, A. M. N. D. Critérios diagnósticos e tratamento da sífilis congênita. **Documento Científico-Departamento de Neonatologia. Sociedade Brasileira de Pediatria**, v. 20, 2010.

HEYMANS, R.; VAN DER HELM, J. J.; DE VRIES, H. J. C.; FENNEMA, H. S. A.; COUTINHO, R. A.; BRUISTEN, S. M. Clinical value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 2, p. 497-502, 2010.

HILL, S. A.; MASTERS, T. L.; WACHTER, J. Gonorrhea-an evolving disease of the new millennium. **Microbial cell**, v. 3, n. 9, p. 371, 2016.

HJELMEVOLL, S. O.; OLSEN, M. E.; SOLLID, J. U. E.; HAAHEIM, H.; UNEMO, M.; SKOGEN, V. A fast real-time polymerase chain reaction method for sensitive and specific detection of the *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 5, p. 574-581, 2006.

HO, E. L.; LUKEHART, S. A. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. **The Journal of clinical investigation**, v. 121, n. 12, p. 4584-4592, 2011.

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 (NAAT): associations with ethnicity, symptoms, and prior and current STIs. **Journal of pediatric and adolescent gynecology**, v. 23, n. 5, p. 312-316, 2010.

HOOK, E. W. Syphilis. **The lancet**, v. 389, n. 10078, p. 1550-57, 2017.

IBÁÑEZ-ESCRIBANO, A., NOGAL-RUIZ, J. J., ARÁN, V. J., ESCARIO, J. A., GÓMEZ-BARRIO, A., ALDERETE, J. F. Determination of internal transcribed spacer regions (ITS) in *Trichomonas vaginalis* isolates and differentiation among *Trichomonas* species. **Parasitology international**, v. 63, n. 2, p. 427-431, 2014.

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

JUNIOR, W. B.; SHIRATSU, R.; PINTO, V. Abordagem nas doenças sexualmente transmissíveis. **An bras dermatol**, v. 84, n. 2, p. 151-59, 2009.

KARP, G.; SCHLAEFFER, F.; JOTKOWITZ, A.; RIESENBERG, K. Syphilis and HIV co-infection. **European journal of internal medicine**, v. 20, n. 1, p. 9-13, 2009.

KAY, C., WOODWARD, K. D., LAWLER, K., SELF, T. J., DYALL, S. D., & KERR, I. D. The ATP-binding cassette proteins of the deep-branching protozoan parasite *Trichomonas vaginalis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1693, 2012.

KE, W.; MOLINI, B. J.; LUKEHART, S. A.; GIACANI, L. *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* TP0136 protein is heterogeneous among isolates and binds cellular and plasma fibronectin via its NH2-terminal end. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003662, 2015.

KENT, B. N. Sexually Transmitted Diseases: Prevalence, Treatment, and Diagnostics. **Clinical Laboratory Science**, v. 30, n. 2, p. 112-113, 2017.

KOHL, P. K.; WINZER, I. The 100 years since discovery of *Spirochaeta pallida*. **Der hautarzt**, v. 52, n. 2, p. 112-115, 2005.

KOJIMA, N.; KLAUSNER, J. D. An update on the global epidemiology of syphilis. **Current epidemiology reports**, v. 5, n. 1, p. 24-38, 2018.

KRIESEL, J. D.; BHATIA, A. S.; BARRUS, C.; VAUGHN, M.; GARDNER, J.; CRISP, R. J. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. **International journal of STD & AIDS**, v. 27, n. 14, p. 1275-1282, 2016.

KUSDIAN, G.; GOULD, S. B. The biology of *Trichomonas vaginalis* in the light of urogenital tract infection. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 198, n. 2, p. 92-99, 2014.

LAFOND, R. E.; LUKEHART, S. A. Biological basis for syphilis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 29-49, 2006.

LASAGABASTER, M. A.; GUERRA, L. O. Sífilis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, p. 1-7, 2019.

LIMA, M L.; HOELZLE, C. R.; SIMÕES, R. T.; LIMA, M. I. M, FRADICO, J. R. B.; MATEO, E. C. C.; ZAULI, D. A. G.; MELO, V. H. Sexually transmitted infections detected by multiplex real time PCR in asymptomatic women and association with cervical intraepithelial neoplasia. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia/RBGO Gynecology and Obstetrics**, v. 40, n. 09, p. 540-546, 2018.

LIMA, Y. A. R.; TURCHI, M. D.; FONSECA, Z. C.; GARCIA, F. L. B.; CARDOSO, F. A. D. B.; GUARDA REIS, M. N.; GUIMARÃES, E. M. B.; ALVES, R. R. F.; CARVALHO, N. R.; ALVES, M. F. C. Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 16-21, 2014.

LIRA, É. C. Diversidade microbiana do trato genital feminino. 2017.

LIU, H.; RODES, B.; CHEN, C. Y.; STEINER, B. New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1941-1946, 2001.

LIU, M. L.; XIA, Y.; WU, X. Z.; HUANG, J. Q.; GUO, X. G. Loop-mediated isothermal amplification of *Neisseria gonorrhoeae* porA pseudogene: a rapid and reliable method to detect gonorrhea. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 48, 2017.

LUPPI, C. G.; OLIVEIRA, R. L. S. D.; VERAS, M. A.; LIPPMAN, S. A.; JONES, H.; JESUS, C. H.; PINHO, A. A.; RIBEIRO, M. C.; CAIAFFA-FILHO, H. Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 14, p. 467-477, 2011.

MA, D. Y.; GIACANI, L.; CENTURIÓN-LARA, A. The molecular epidemiology of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. **Sexual health**, v. 12, n. 2, p. 141-147, 2015.

MACHADO FILHO, A. C.; SARDINHA, J. F. J.; PONTE, R. L.; COSTA, E. P. D.; DA SILVA, S. S.; MARTINEZ-ESPINOSA, F. E. Prevalência de infecção por HIV, HTLV, VHB e de sífilis e clamídia em gestantes numa unidade de saúde terciária na Amazônia ocidental brasileira. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 4, p. 176-183, 2010.

MACHADO, E. R.; DE SOUZA, L. P. Tricomoníase: assistência de enfermagem na prevenção e controle. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 4, 2015.

MACIEL, G. P.; TASCA, T.; DE CARLI, G. A. Aspectos clínicos, patogênese e diagnóstico de *Trichomonas vaginalis*. **J Bras Patol Med Lab**, v. 40, n. 3, p. 152-160, 2004.

MADICO, G.; THOMAS C. Q.; ANNE R.; KELLY T. M. JR.; CHARLOTTE A. G. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* Infection by PCR Using Vaginal Swab Samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 36, n. 11, p. 3205-3210, 1998.

MARIÑO, J. M. Análise da estratégia de rastreio do câncer do colo do útero por autocoleta e teste rápido para HPV em mulheres ribeirinhas do município de Coari/AM. 2015.

MARKLE, W.; CONTI, T.; KAD, M. Sexually Transmitted Diseases. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 40, n. 3, p. 557-587, 2013.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 16, n. 1, p. 47-51, 2002.

MARTINS, MARTINS, T. A., BELLO, P. Y., PONTES, L. R. S. K., COSTA, L. V., MIRALLES, I. S., & QUEIROZ, T. R. B. S. As doenças sexualmente transmissíveis são problemas entre gestantes no Ceará. **DST J Bras Doenças Sex Transm**, v. 16, n. 3, p. 50-8, 2004.

MATTEI, P. L.; BEACHKOFISKY, T. M.; GILSON, R. T.; WISCO, O. J. Syphilis: a reemerging infection. **American family physician**, v. 86, n. 5, 2012.

MAYAUD, P.; MCCARTNEY, D.; MABEY, D. Sexually transmitted infections. In: **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases**. p. 52-68, 2020.

MELGAÇO, F. G.; ROSA, M. L.; AUGUSTO, E. F.; HAIMURI, J. G.; JACINTHO, C.; SANTOS, L. S.; CAVALCANTI, S. M. B.; OLIVEIRA, L. H. S. Human papillomavirus genotypes distribution in cervical samples from women living with human immunodeficiency virus. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 283, n. 4, p. 809-817, 2011.

MERTZ, K. J. et al. Etiology of Genital Ulcers and Prevalence of Human Immunodeficiency Virus Coinfection in 10 US Cities. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 178, n. 6, p. 1795-8, 1998.

MIRANDA, A. E.; PINTO, V. M.; GAYDOS, C. A. Trichomonas vaginalis infection among young pregnant women in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 669-671, 2014.

MIRANDA, A. E.; SILVEIRA, M. F.; TRAVASSOS, A. G.; TENÓRIO, T.; VAL, I. C. C. D.; LANNOY, L. D.; JUNIOR, H. S. M.; CARVALHO, N. S. Prevalence of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoea and associated factors among women living with Human Immunodeficiency Virus in Brazil: a multicenter study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 402-407, 2017.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-65, 1990.

NEWMAN, L.; ROWLEY, J.; HOORN, S. V.; WIJESOORIYA, N. S.; UNEMO, M.; LOW, N.; TEMMERMAN, M. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. 0143-304, 2015.

NG, L. K.; MARTIN, I. E. The laboratory diagnosis of Neisseria gonorrhoeae. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 15-25, 2005.

NGWANYA, R. M.; KAKANDE, B.; KHUMALO, N. P. Double Morphology: Tertiary Syphilis and Acquired Immunodeficiency Syndrome—A Rare Association. **Case reports in dermatological medicine**, v. 2017, p. 1-3, 2017.

NOH, C. S.; KIM, S. S., PARK, S. Y., MOON, H. S., HONG, Y.; RYU, J. S. Comparison of Two PCR Assays for *Trichomonas vaginalis*. **The Korean journal of parasitology**, v. 57, n. 1, p. 27, 2019.

OLIVEIRA, M.C.S.; REGITANO, L.C.A.; ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M.M.; SCAGLIUSI, S.M.M.; TIMÓTEO, W.H.B.; JARDIM, S.N. Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste-Livro científico (ALICE)**, 2007.

PADOVANI, C.; OLIVEIRA, R. R.; PELLOSO, S. M. Sífilis na gestação: associação das características maternas e perinatais em região do sul do Brasil. **Rev Latino-Am Enfermagem**, v. 26, p. e3019, 2018.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). Elimination of mother-to-child transmission of HIV and syphilis in the Americas. Update 2016. Washington, USA 2017. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34072/9789275119556-eng.pdf?sequence=4&isAllowed=y>.

PASSOS, MRL. DST 5 – Doenças sexualmente transmissíveis (Dessetologia), 5ª Edição, **ed.Cultura Médica**, 2005, p225-233.

PAZ-BAILEY G.; KILMARX P.; SUPAWITKUL S.; CHAOWANACHAN T.; JEEYAPANT S.; STERNBERG M.; MARKOWITZ L.; MASTRO T. D.; GRIENSVEN F. V. Risk factors for sexually transmitted diseases in Northern Thai adolescents. **Sex Transm Dis**, v. 30, n. 4, p. 320-326, 2002.

PEELING, R. W.; MABEY, D.; KAMB, M. L.; CHEN, XIANG-SHENG, RADOLF, J. D.; BENZAKEN, A. S. Syphilis. **Nat Rev Dis Primers**, p. 1-49, 2017.

PENG, R. R.; WANG, A. L.; LI, J.; TUCKER, J. D.; YIN, Y. P.; CHEN, X. S. Molecular typing of *Treponema pallidum*: a systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 11, p. e1273, 2011.

PENNA, G. O.; HAJJAR, L. A.; BRAZ, T. M. Gonorrhoea. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 451-464, 2000.

PESSÔA, S. B. *Trichomonas vaginalis*. **Revista de Medicina**, v. 26, n. 104, p. 7-16, 1942.

PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R.; GARBER, G. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 2, p. 300-317, 1998.

Pětrošová, H.; Zobaníková, M.; Čejková, D.; Mikalová, L.; Pospíšilová, P.; Strouhal, M. Whole genome sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, strain Mexico A, suggests recombination between yaws and syphilis strains. **PLoS Negl Trop Dis**. V. 6, n. 9, 2012.

PIAZZETTA, R. C. P. S.; CARVALHO, N. S.; ANDRADE, R. P.; PIAZZETTA, G.; PIAZZETTA, S. R.; CARNEIRO, R. Prevalência da infecção por Chlamydia

Trachomatis e Neisseria Gonorrhoea em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do Sul do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 11, p. 328-33, 2011.

PINTO, D. D. S.; FUZII, H. T.; QUARESMA, J. A. S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 27, p. 769-778, 2011.

PINTO, V. M.; BASSO, C. R.; BARROS, C. R. D. S.; GUTIERREZ, E. B. Fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis: inquérito populacional no município de São Paulo, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 2423-2432, 2018.

PIPERAKI, E. T.; THEODORA, M.; MENDRIS, M.; BARBITSA, L.; PITIRIGA, V.; ANTSAKLIS, A.; TSAKRIS, A. Prevalence of Trichomonas vaginalis infection in women attending a major gynaecological hospital in Greece: a cross-sectional study. **Journal of clinical pathology**, v. 63, n. 3, p. 249-253, 2010.

PIRES, I. C. P.; MIRANDA, A. E. B. Prevalência e fatores correlatos de infecção pelo HIV e sífilis em prostitutas atendidas em centro de referência DST/AIDS. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 20, n. 3, p. 151-154, 1998.

POGETTO, B. D.; RODRIGUES, M.; SILVA, M. G. D.; GARCIA DE LIMA PARADA, C. M. Prevalência de doenças sexualmente transmissíveis em mulheres profissionais do sexo, em um município do interior paulista, Brasil. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, p. 493-499, 2011.

RAFFE, S.; SONI, S. Diagnostic tests for sexually transmitted infections. **Medicine**, v. 46, n. 5, p. 277-282, 2018.

RAMOS, M. C.; BECKER D.; GERMANY C.; SANDER, M. A.; STEIN, A.; FAGUNDES R. A. L.; FILGUEIRA, A.; CESTARI T. Estudo Populacional DE Prevalência DE Chlamydia TRACHOMATIS. **DST-J bras Doencas Sex Transm**, v. 15, n. 2, p. 20-25, 2003.

RATNAM, S. The laboratory diagnosis of syphilis. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 45-51, 2005.

REIS, R. d. S. Detecção e genotipagem de papilomavírus humano de alto risco em amostras cervicais de mulheres do município de Coari, Amazonas. 2017.

RIETMEIJER, C. A. Improving care for sexually transmitted infections. **Journal of the International AIDS Society**, v. 22, p. e25349, 2019.

ROCHA, D. A. P.; FILHO, R. A. A. B.; MARIÑO, J. M.; SANTOS, C. M. B. D. "Hidden" sexually transmitted infections among women in primary care health services, Amazonas, Brazil. **International journal of STD & AIDS**, v. 25, n. 12, p. 878-886, 2014.

ROCHA, D. et al. *Chlamydia trachomatis* infection in women living in remote areas in Amazonas, Brazil—a self-collection screening experience. **International Journal of STD & AIDS**, p. 095646241880929, 2018.

ROCHA, D.; MORAES, C. O.; ARAÚJO, A. F., DOS SANTOS BELTRÃO, Ê.; CASTELO DOS SANTOS, L.; DA MATA, L. M.; NN XAVIER, A.; REIS, R.S.; CC SOARES, S.; TORRES, K. L.; E LEVI, J.; M MARIÑO, J. Chlamydia trachomatis infection in women living in remote areas in Amazonas, Brazil—a self-collection screening experience. **International journal of STD & AIDS**, v. 30, n. 4, p. 336-343, 2019.

ROCHA, Danielle Albuquerque Pires *et al.* Epidemiologia molecular de patógenos sexualmente transmissíveis em mulheres no município de Coari, Amazonas. 2012.

RODRIGUES, L. L.; HARDICK, J.; NICOL, A. F.; MORGADO, M. G.; MARTINELLI, K. G.; DE PAULA, V. S.; GAYDOS, C. A. Sexually transmitted infections among HIV-infected and HIV-uninfected women in the Tapajós region, Amazon, Brazil: Self-collected vs. clinician-collected samples. **PloS one**, v. 14, n. 4, p. e0215001, 2019.

RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ, M.; CÓRDOBA, J. J.; ANDRADE, M. J. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In: **PCR Primer Design**. v. 1275, p. 31-56, 2015.

ROGSTAD, K. E. Sexually transmitted infections and travel. **Current opinion in infectious diseases**, v. 32, n. 1, p. 56-62, 2019.

ROSSETTI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. J. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular. **Rio de**, 2006.

ROSTAMI, M. N.; RASHIDI, B. H.; NAZARI, R.; AGHSAGHLOO, F.; HABIBI, A. A multiplex assay of *Trichomonas vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in genital specimens. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 11, p. 833-839, 2017.

SAMRA, Z.; ROSENBERG, S.; MADAR-SHAPIRO, L. Direct simultaneous detection of 6 sexually transmitted pathogens from clinical specimens by multiplex polymerase chain reaction and auto-capillary electrophoresis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 70, n. 1, p. 17-21, 2011.

SANTOS, F. M. Detecção Molecular de *Neisseria gonorrhoeae* em Mulheres com Citologia Normal. 2014.

SCHIELKE, S.; FROSCHE, M.; KURZAI, O. Virulence determinants involved in differential host niche adaptation of *Neisseriameningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **Medical microbiology and immunology**, v. 199, n. 3, p. 185-196, 2010.

SCHIRM, J.; BOS, P. A.; ROOZEBOOM-ROELFSEMA, I. K.; LUIJT, D. S.; MÖLLER, L. V. *Trichomonas vaginalis* detection using real-time TaqMan PCR. **Journal of microbiological methods**, v. 68, n. 2, p. 243-247, 2007.

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

SECOR, W. E.; MEITES, E.; STARR, M. C.; WORKOWSKI, K. A. Neglected parasitic infections in the United States: trichomoniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 90, n. 5, p. 800-804, 2014.

SHAKYA, S.; THINGULSTAD, S.; SYVERSEN, U.; NORDBØ, S. A.; MADHUP, S.; VAIDYA, K.; KARMACHARYA, B. M.; ÅSVOLD, B. O.; AFSET, J. E. Prevalence of Sexually Transmitted Infections among Married Women in Rural Nepal. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 2018, 2018.

SILVA, F. A. R. Citologia vaginal a fresco na gravidez: correlação com a citologia corada pela técnica de Papanicolaou. **RBGO**, v. 26, n. 7, 2004.

SILVA, G. A. R.; MOTTA, H. L. S. N.; SOUZA, E. F. A.; CARDOSO, P. A. N. M.; PILOTTO, J. H.; EYER-SILVA, W. A.; RIBEIRO, L. C. P.; SANTOS, M. S.; AZEVEDO, M. C. V. M.; PINTO, J. F. C.; MOTTA, R. N.; FERRY, F. R. A. Prevalence of asymptomatic urethritis by Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae and associated risk factors among males living with HIV-1. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, 2018.

SILVA, L. C. F.; MIRANDA, A. E.; BATALHA, R. S.; MONTE, R. L.; TALHARI, S. Trichomonas vaginalis and associated factors among women living with HIV/AIDS in Amazonas, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 6, p. 701-703, 2013.

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

SOUZA, E. M. Há 100 anos, a descoberta do Treponema pallidum. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 5, p. 547-548, 2005.

SOUZA, R. P.; DE ABREU, A. L.; FERREIRA, E. C.; ROCHA-BRISCHILIARI, S. C.; CARVALHO, M. D. D. B.; PELLOSO, S. M.; CONSOLARO, M. E. Simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in human immunodeficiency virus-infected Brazilian women by multiplex polymerase chain reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n. 6, p. 1199-1202, 2013.

SPEAR, G. T.; FRENCH, A. L.; GILBERT, D.; ZARIFFARD, M. R.; MIRMONSEF, P.; SULLIVAN, T. H.; HAMAKER, B. R. Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by Lactobacillus. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 7, p. 1019-1028, 2014.

SPEERS, D. J.; RYAN, S.; HARNETT, G.; CHIDLOW, G. Diagnosis of malaria aided by polymerase chain reaction in two cases with low-level parasitaemia. **Internal medicine journal**, v. 33, n. 12, p. 613-615, 2003.

SUKTHANKAR, A. Syphilis. **Medicine**, v. 42, n. 7, p. 394-398, 2014.

SUSO, M. T. G.; SANZ, J. M.; REDONDO, R. G.; ZAPATA, M. R. Infecciones por treponemas. Sífilis. **Enfermedades Infecciosas**, v. 12, n. 59, p. 3435-46, 2018.

TAFFA, N., BJUNE, G., SUNDBY, J., GAUSTAD, P., & ALESTRØM, A. Prevalence of gonococcal and chlamydial infections and sexual risk behavior among youth in Addis Ababa, Ethiopia. **Sexually transmitted diseases**, v. 29, n. 12, p. 828-833, 2002.

TAMER, E.; ÇAKMAK, S. K.; İLHAN, M. N.; ARTÜZ, F. Demographic characteristics and risk factors in Turkish patients with anogenital warts. **Journal of infection and public health**, v. 9, n. 5, p. 661-666, 2016.

TOBIASON, D. M.; SEIFERT, H. S. Genomic content of *Neisseria* species. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 8, p. 2160-2168, 2010.

TONG, M. L.; ZHAO, Q.; LIU, L. L.; ZHU, X. Z.; GAO, K.; ZHANG, H. L.; LIN, L. R.; NIU, J. J.; JI, Z. L.; YANG, T. C. Whole genome sequence of the *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* strain Amoy: An Asian isolate highly similar to SS14. **PLoS one**, v. 12, n. 8, p. 4-10, 2017.

TRAVASSOS, A. G.; XAVIER-SOUZA, E.; NETTO, E.; DANTAS, E. V.; TIMBÓ, M.; NÓBREGA, I.; HAGUIHARA, T.; NEUMAYER, J.; LISBOA, N.; SOIDAN, M. A.; FERREIRA, F.; BRITES, C. Anogenital infection by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-infected men and women in Salvador, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 6, p. 569-575, 2016.

TURCHI, C.; PESARESI, M.; PRESCIUTTINI, S.; ALESSANDRINI, F.; SASSAROLI, C.; TAGLIABRACCI, A. Development and forensic applications of multiplex PCR of autosomal biallele polymorphisms. In: **International Congress Series. Elsevier**, p. 213-215, 2004.

UNEMO, M.; NORLEN, O.; FREDLUND, HANS. The *porA* pseudogene of *Neisseria gonorrhoeae*—low level of genetic polymorphism and a few, mainly identical, inactivating mutations. **Apmis**, v. 113, n. 6, p. 410-419, 2005.

UNEMO, M.; SHAFER, W. M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 3, p. 587-613, 2014.

VAN DER POL, B. Clinical and laboratory testing for *Trichomonas vaginalis* infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 1, p. 7-12, 2016.

VAN DOORNUM, G. J. J.; SCHOULS, L. M.; PIJL, A.; CAIRO, I.; BUIMER, M.; BRUISTEN, S. Comparison between the LCx Probe System and the COBAS AMPLICOR System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections in Patients Attending a Clinic for Treatment of Sexually Transmitted Diseases in Amsterdam, The Netherlands. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 3, p. 829-835, 2001.

VARGAS, L.; AMARAL, S.; ARRIAGA, M.; SARNO, M.; BRITES, C. High prevalence of syphilis in parturient women and congenital syphilis cases in public maternities in Salvador-Bahia, Brazil. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 125, n. 10, p. 1212-1214, 2018.

VINCENT, L. R.; JERSE, A. E. Biological feasibility and importance of a gonorrhea vaccine for global public health. **Vaccine**, p. 1-8, 2018.

WAHAB, A. A.; RAHMAN, M. M.; MOHAMMAD, M.; HUSSIN, S. Case series of syphilis and HIV co-infections. **Pakistan journal of medical sciences**, v. 29, n. 3, p. 856, 2013.

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* pseudogene. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 23, n. 9, p. 705-710, 2004.

WHILEY, D. M.; TAPSALL, J. W.; SLOOTS, T. P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*: an ongoing challenge. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 8, n. 1, p. 3-15, 2006.

WHO et al. **Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections-2008**. World Health Organization, 2012.

WI, T.; LAHRA, M. M.; NDOWA, F.; BALA, M.; DILLON, J. A. R.; RAMON-PARDO, P.; EREMIM, S. R.; UNEMO, M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: Global surveillance and a call for international collaborative action. **PLoS medicine**, v. 14, n. 7, p. e1002344, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. **Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, syphilis and *Trichomonas vaginalis*: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates**. World Health Organization, 2011.

YUSOF, A. M.; KUMAR, S. Phenotypic 'variant' forms of *Trichomonas vaginalis* trophozoites from cervical neoplasia patients. **Experimental parasitology**, v. 131, n. 3, p. 267-273, 2012.

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1 – Ficha de Identificação

Diagnóstico de Infecções Sexualmente Transmissíveis em Mulheres Ribeirinhas – A autocoleta como Estratégia Acessível a Todas

Ficha de identificação

1. Nome: _____

2. Data de nascimento: ____/____/____ 2. Idade: _____

3. Comunidade: _____

4. Escolaridade: 1. Não escolarizada () 2. Fundamental incompleto () 3. Fundamental completo ()

4. Médio Completo () 5. Superior completo ()

5. Trabalha? 1. Sim () 2. Não ()

6. Se sim, qual a ocupação?

Ficha n. _____

Entrevistador: _____

Data: _____

7. Renda familiar: _____

8. Estado conjugal: 1. Casada/união estável () 2. Solteira () 3. Viúva/Divorciada/Separada ()

9. Parceria sexual atualmente: 1. Sem parceiro () 2. Somente 1 parceiro fixo ()

3. Mais de 1 parceiro fixo () 4. Somente parceiros eventuais () 5. Parceiro fixo + eventuais ()

10. Usa preservativo sempre com parceiro fixo? 1. Sim () 2. Não () 3. Não tenho parceiro fixo

11. Por que? _____

12. Usa preservativo sempre com parceiros eventuais? 1. Sim () 2. Não () 3. Não tenho parceiro eventuais ()

13. Por que? _____

14. Idade da primeira relação sexual. _____

15. Número de gestações _____

16. Idade da primeira gestação _____

17. Número de abortos espontâneos _____

18. Número de parceiros ao longo da vida _____

19. Apresentando queixas clínicas? 1. Não () 2. Corrimento () 3. Prurido () 4. Verrugas genitais ()

5. Úlceras genitais () 6. Dor ao urinar () 7. Dor pélvica () 8. Dor após relação sexual ()

9. Sangramento após relação sexual () 10. Outra () _____

20. Já teve alguma IST? 1. Sim () 2. Não () 3. Nunca fez exame de DST ()

21. Se sim, qual? _____

22. Já fez preventivo de câncer de colo de útero? 1. Sim () 2. Não ()

23. Se sim, quando realizou seu último preventivo? 1. Menos de 1 ano () 2. Entre 1 e 2 anos ()

3. Entre 2 e 3 anos () 4. Entre 3 e 4 anos () 5. Entre 4 e 5 anos () 6. Mais de 5 anos ()

- 24. Se não, por que?** 1. Tem medo () 2. Tem vergonha () 3. Nunca ouvi falar
4. Difícil acesso () 5. Falta de tempo () 6. Outro () _____

Depois da coleta

- 26. Conseguiu fazer a autocoleta?** 1. Sim () 2. Não ()
- 27. Foi difícil?** 1. Sim () 2. Não ()
- 28. Doeu?** 1. Sim () 2. Não ()
- 29. Prefere essa ou a coleta do profissional?** 1. Autocoleta () 2. Coleta com profissional ()
- 30. Se prefere a autocoleta, por que?** _____
- 31. Se prefere com profissional, por que?** _____

9.2. Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Diagnóstico de Infecções Sexualmente Transmissíveis em Mulheres Ribeirinhas – a Autocoleta como Estratégia Acessível a Todas

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos a Senhora para participar da Pesquisa " Diagnóstico de Infecções Sexualmente Transmissíveis em Mulheres Ribeirinhas – a Autocoleta como Estratégia Acessível a Todas", sob a responsabilidade da pesquisadora Dra. Danielle Albuquerque Pires Rocha, a qual pretende identificar algumas infecções sexualmente transmissíveis em mulheres ribeirinhas no Estado do Amazonas. Sua participação é voluntária e se dará respondendo a um questionário (que será aplicado por um dos participantes da equipe da pesquisa) e coletando com um delicado swab vaginal uma amostra de células vaginais e do colo de útero. O material coletado será utilizado unicamente para os objetivos dessa pesquisa. Necessito de sua autorização para coletar, guardar e usar este material para pesquisas futuras dentro desta mesma linha de estudo (segundo consta na resolução 411/11 do Conselho Nacional de Saúde). Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição. Caso o material coletado não se encontre em condições de armazenagem, necessito de sua autorização para o descarte dos mesmos. A senhora será informada quanto a perdas ou destruição de suas amostras biológicas. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos sendo apenas pequeno incômodo no momento da coleta do material. Se depois de consentir sua participação a senhora desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, bem como retirar o consentimento de guarda e utilização de sua amostra biológica independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa, nem do seu tratamento ou atendimento no serviço de saúde. A Sra. não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados em artigos científicos, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer acesso aos resultados da pesquisa ou outra informação, a Sra poderá entrar em contato com os pesquisadores no endereço Estrada Coari Mamiã, 305, Bairro Espírito Santo, Coari, Amazonas, e pelo telefone 35612363.

Consentimento Pós-Informação

Eu, _____, fui informada sobre o que os pesquisador es pretendem realizar e porque precisam da

minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Haverá necessidade de novo consentimento para uma nova pesquisa com o material armazenado ()

Dispensar o novo consentimento a cada pesquisa ()

Coari, ___/___/___

Assinatura da participante - Paciente



9.3. Anexo 3 - Folder ilustrativo da tecnica de autocoleta

Modo de Uso



Passo 1
Higienize as mãos.



Passo 2
Abra a embalagem, conforme a ilustração.



Passo 3
Retire o dispositivo da embalagem, conforme a ilustração.



Passo 4
Segure o tubo, sem tocar nas cerdas coletoras.



Passo 5
Adote posição confortável para coleta, conforme a ilustração.



Passo 6
Insira as cerdas coletoras na vagina, não ultrapassando a aba limitadora de profundidade.



Passo 7
Gire o dispositivo por 5 voltas completas para coletar o máximo possível de material.



Passo 8
Retire o dispositivo tomando cuidado para não tocar nas cerdas. Desrosqueie a tampa até liberá-la do tubo.



Passo 9
Introduza cuidadosamente as cerdas no tubo e rosqueie até o fechamento firme e completo do conjunto tubo-haste.



Passo 10
Entregue o **Coan** conforme as orientações recebidas.

9.4. Anexo 4 - protocolo RELIAPREP – Extração de DNA

Preparação das amostras cervico-vaginal - autocoletada

Cortar as cerdas da escova de autocoleta com uma lâmina bisturi dentro de um microtubo de 1,5ml.

Adicionar 1ml de água destilada no microtubo e agitar no vórtex por 10 segundos.

Centrifugar por 5min a 9.650 rpm (10.000 x g.).

Descartar o sobrenadante e as cerdas.

Adicionar 200 µL de água destilada no microtubo contendo o concentrado de células (pellet) e agitar no vórtex para tentar dissolver ao máximo o pellet.

A amostra segue o protocolo de extração.

- Extração de DNA

1. Adicionar 15 µL de solução de proteinase K (PK) na amostra e misturar brevemente.
2. Adicionar 200 µL de tampão de lise celular (CLD) ao tubo. Fechar o tubo e misturar por 10 segundos no vórtex – este passo no vórtex é essencial para obter bons rendimentos.
3. Incubar a 56 °C durante 15 minutos no termobloco.
4. Enquanto a amostra está incubando, coloque a coluna de ligação ReliaPrep no tubo coletor vazio.
5. Após a incubação, adicionar 250 µL de tampão de ligação (BBA), fechar o microtubo e misturar por 10 segundos no vórtex – este passo no vórtex é essencial para obter bons rendimentos.
6. Transferir o conteúdo do tubo de centrifugação para a coluna de ligação ReliaPrep. Tampar e colocar na microcentrífuga.
7. Centrifugar por 1 minuto a 11.500 rpm (14.000 x.g). Verifique a coluna de ligação para se certificar de que o lisado passou completamente pela membrana.

Se o lisado ainda estiver visível no topo da membrana, centrifugue a coluna por mais 1 minuto.

NOTA: A amostra pode ser centrifugada a uma velocidade mais baixa, se desejado. Para isso, aumente o tempo de centrifugação em conformidade para garantir que o lisado tenha passado completamente pela membrana.

8. Remover o coletor e descartar o resíduo contaminado.

9. Adicionar 500 μ L de solução de lavagem de coluna (CWD) à coluna de centrifugue por 3 minutos à 11.500 rpm (14.000 x.g). Descarte o resíduo.

10. Adicionar 500 μ L de solução de lavagem de coluna (CWD) à coluna de centrifugue por 3 minutos à 11.500 rpm (14.000 x.g). Descarte o resíduo.

11. Adicionar 500 μ L de solução de lavagem de coluna (CWD) à coluna de centrifugue

por 3 minutos à 11.500 rpm (14.000 x.g). Descarte o resíduo.

12. Colocar a coluna em novo tubo coletor.

13. Adicionar 140 μ L de Água livre nuclease à coluna e centrifugar por 1 minuto à 11.500 rpm (14.000 x.g).

14. Descartar a coluna de ligação ReliaPrep.

15. Fazer alíquotas e armazenar o eluído que contém o DNA.