

DETECÇÃO DE *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* EM AMOSTRAS CERVICAIS ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Alisson Messalas Vargas Faria¹

Vera Mileide Trivellato Grassi²

Tanise Machado Telles³

Márcia Susana Nunes Silva⁴

RESUMO

A *Chlamydia trachomatis* (CT) é o agente etiológico mais prevalente em infecções sexualmente transmissíveis (IST). Além disso, existe uma alta prevalência de casos assintomáticos constituindo um sério problema para a saúde pública. O objetivo deste trabalho foi detectar a presença da CT em 100 amostras cervicais de mulheres com resultados sorológicos negativos para o vírus HIV, através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Este trabalho mostrou que a técnica de PCR pode ser utilizada para o diagnóstico de CT, já que o estudo detectou a presença de CT em 12% das amostras, mostrando que a utilização de um teste molecular pode ser uma ferramenta de extrema importância para o diagnóstico deste agente em poucas horas.

Palavras-chave: *Chlamydia trachomatis*, IST, PCR.

ABSTRACT

Chlamydia trachomatis (CT) is the most prevalent etiological agent in sexually transmitted infections (STIs). In addition, there is a high prevalence of asymptomatic cases constituting a serious problem for public health. The present diagnosis was performed on 100 cervical samples from HIV-infected women through the polymerase chain reaction (PCR). This work was developed with a PCR technique to be used for the diagnosis of CT, since the study detected the presence of CT in 12% of the samples, showing that it is a molecular test of a tool of extreme importance for the diagnosis of this agent in a few hours.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, STI, PCR.

INTRODUÇÃO

A *Chlamydia trachomatis* (CT) é o agente etiológico mais provável de ser encontrado nas infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) no mundo (MACLEOD & SMITH, 1999), podendo causar infertilidade em ambos sexos, doença inflamatória

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina/ULBRA- Bolsista FAPERGS

² Doutoranda no PPGBiosáude

³ Mestre do PPGBiosáude

⁴ Professora do Curso de Graduação de Biomedicina e PPGTA.MP (marcia_susana@hotmail.com)

pélvica e gravidez ectópica (KECK et al., 1998; COSTA-LIRA et al., 2017). Um dos problemas da infecção por CT é a alta prevalência de casos assintomáticos, fazendo com que pacientes infectados disseminem o patógeno sem ter ciência de tal fato, ressaltando a importância da detecção do patógeno para controle e detecção da doença.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a cada ano ocorram em torno de 92 milhões de novos casos de infecção por CT, dos quais a maioria é observada em países em desenvolvimento, afetando principalmente adolescentes e jovens (PIAZZETTA et al., 2011). No Brasil, calcula-se que ocorram cerca de 1.967.200 novos casos de infecção por CT, embora não esteja incluída entre as ISTs de notificação compulsória. Estudos estimam que a infecção por esta bactéria na população brasileira varie de 9,1 a 14,3% (COSTA-LIRA et al., 2017).

A CT é uma bactéria com parede celular semelhante às Gram-negativas, não móvel e parasita celular obrigatória com tropismo pelas células conjuntivas e urogenitais (SOMANI et al., 2000; SILVA, 2014). Possui 19 sorotipos que são classificados baseados na variação antigênica da proteína de membrana majoritária (MOMP). Os sorotipos provocam diferentes infecções que ocorrem, principalmente no aparelho reprodutor feminino, embora a maioria dos casos seja assintomática, e os sintomas quando ocorrem, são na maioria das vezes corrimento vaginal e disúria (KÖKSAL et al., 2016). Ela é considerada uma das principais causadoras de infertilidade, além de causar gravidez ectópica, uretrites, salpingites, cervicites, endometriose e doença inflamatória pélvica (DIP) (BECKER, 2005).

O maior desafio no controle da infecção por CT está no fato de que 70 a 80% das mulheres e 50% dos homens infectados são assintomáticos, tornando-se potenciais transmissores da infecção aos seus parceiros. Outro fator importante é que a imunidade desenvolvida com a infecção é apenas parcialmente protetora, tornando a taxa de recorrência da infecção bastante alta (MIRANDA et al., 2017). Estas infecções rompem a barreira epitelial e geram processos inflamatórios que aumentam a infectiosidade do HIV nos indivíduos infectados por este vírus, sendo que as coinfeções genitais aumentam os níveis destes nas secreções genitais, aumentando assim a transmissão sexual secundária (KAUL et al., 2008; KINSSEGER et al., 2009).

Na presença das ISTs ocorre a potencialização da susceptibilidade dos parceiros HIV-negativos pela elevação do número de células disponíveis para invasão do HIV e nos parceiros HIV-positivos, devido ao aumento no número de células com vírus a ser inoculado (KAUL et al., 2008). Em indivíduos infectados por HIV, as coinfeções genitais aumentam os níveis de HIV nas secreções genitais, resultando no aumento da transmissão sexual secundária (KAUL et al., 2008; KINSSEGER et al., 2009).

Este estudo teve como objetivo detectar a presença da CT em amostras cervicais de mulheres com resultados sorológicos negativos para o vírus HIV utilizando a PCR para detectar a presença da bactéria.

MATERIAS E MÉTODOS

Amostras

As amostras cervicais utilizadas foram provenientes de um banco de amostras do Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA/Canoas. Deste, 100 amostras foram selecionadas para o estudo proposto, com resultados confirmatórios de HIV negativo pelo teste de sorologia anti-HIV (ELISA). As amostras selecionadas para este estudo foram de mulheres que realizaram o exame citopatológico de rotina, atendidas em uma unidade de saúde básica (UBS) do município de Caxias/MA. A coleta foi realizada duplamente, onde uma amostra foi encaminhada para o serviço padrão do município e segunda amostra destinada para a pesquisa.

Extração e Amplificação do DNA

A extração de DNA das amostras foi realizada através da utilização do kit da Roche, *High Pure Viral Nucleic Acid Kit*, conforme instruções do fabricante.

Amplificação do DNA extraído foi realizada através da utilização dos primers CTP1 e CTP2, que amplificam um segmento de 201pb da ORF de número 4 do plasmídeo críptico da CT, conforme descrito por LAN et al. (1993).

CTP1: 5`TAG TAA CTG CCA CTT CAT CA 3`

CTP2: 5`TTC CCC TTG TAA TTC GTT GC 3`

As amostras foram preparadas e submetidas às condições estabelecidas pelo autor para amplificação do DNA. Foi preparada uma mistura com tampão 10X, 3 mM MgCl₂, 200 μM de cada dNTPs, 125 ng de cada primer e 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase. A amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 4 minutos. O produto gerado foi um amplicon de 201 pb.

O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,05% de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta (Figura 1). O controle positivo usado na reação foi o próprio DNA da CT e o negativo uma mistura dos componentes da reação, livre de DNA.

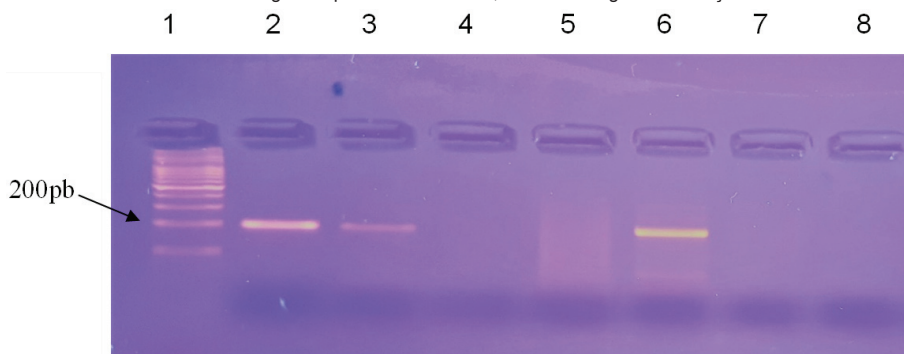
Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em seres Humanos da Universidade Estadual do Maranhão com o número de protocolo nº 891.746 e do Comitê de Ética de pesquisa em seres Humanos da ULBRA (CEP-ULBRA 2007-379H).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados através da técnica de PCR convencional um total de 100 amostras com resultados negativos para HIV onde foi possível detectar a amplificação do DNA da *Chlamydia* em 12% das amostras (Figura 1).

Figura 1 – Imagem representativa de uma análise eletroforética em gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos com *primers* específicos para *C. trachomatis* a partir de amostras cérvico-vaginais. 1: marcador de tamanho molecular 100pb. 2. controle positivo da reação; 3 e 6 amostras positivas para *C. trachomatis*; 4, 5 e 7 amostras negativas para *C. trachomatis*; 8 controle negativo da reação.



A infecção por CT é atualmente uma das mais prevalentes ISTs compondo um grupo recorrente tal como a sífilis e a gonorreia. Pelo fato de ser assintomática ajuda a perpetuar a infecção, tornando o diagnóstico laboratorial um grande desafio, pois os métodos hoje utilizados ainda não são os mais adequados. O tipo de amostra e o método de coleta influenciam na sensibilidade e na especificidade do diagnóstico. O exame mais utilizado é a cultura que pode ser feita através de swab endocervical e uretral, entretanto este procedimento demora em torno de 3 a 7 dias além de ser dispendioso (ANDRADE et al., 2014).

Os testes sorológicos não são os mais adequados, pois as infecções superficiais não são boas estimulantes para a formação de anticorpos (PROTO, et al., 2014). Já os testes rápidos que usam a imunocromatografia, tem uma menor especificidade e sensibilidade que os moleculares, mas ficam prontos em 5 minutos, o que facilita o tratamento do paciente que não irá precisar de uma nova consulta para o diagnóstico (MEYER, 2016).

Com o desenvolvimento dos testes de amplificação de ácidos nucleicos, que são mais sensíveis que os tradicionais, excluiu-se a necessidade do cultivo bacteriano possibilitando um diagnóstico através do uso de amostras colhidas por métodos pouco invasivos (KOKSAL et al., 2016; MIRANDA et al., 2017).

De acordo com uma meta-análise conduzida por Roshani et al. (2018) no Irã, a prevalência de mulheres infectadas por CT chegou a 15%. Destaca-se também um estudo realizado por Lewis et al. (2012) na Austrália, que estimou em 22,1% a prevalência de mulheres indígenas com menos de 25 anos infectadas por CT.

No Brasil, a comparação entre medidas é difícil devido aos diversos testes de diagnóstico utilizados e as amostras populacionais não comparáveis (PIAZZETTA et al., 2011). A dificuldade na obtenção de dados concretos sobre a prevalência da CT ocorre devido à ausência de uma notificação compulsória, além de não existirem programas específicos do Ministério da Saúde (MS) que incentivem o rastreamento da doença (DE GOES et al., 2009).

Um estudo envolvendo 6 capitais brasileiras em 2005 mostrou uma prevalência média de 9,4% para a CT (JALIL et al., 2008). Já em Goiânia, uma análise com mulheres assintomáticas na região sul do Brasil, encontrou-se uma prevalência de 12,6%. No caso de mulheres submetidas à fertilização assistida, a prevalência da CT foi de 40 %, indicativo da importância do controle e prevenção de sequelas provocadas por essa infecção (IGANSI, 2005; PROTO et al., 2013).

Os resultados encontrados no nosso estudo também estão de acordo com os encontrados na literatura, como mostra IGANSI (2005) que realizou um estudo com mulheres, utilizando a técnica de PCR constatou 12,6%(152/1208) de mulheres positivas para CT. Outra pesquisa realizada foi com mulheres gestantes, com a faixa etária próxima de 20 anos de idade, onde encontrou-se uma prevalência de 9,4% de CT (IC95%=8,4-10,5). Estes resultados são semelhantes aos relatados em outros países, mesmo nos mais desenvolvidos, refletindo, portanto, o cenário mundial (JALIL et al., 2008).

Pesquisadores mostram um estudo feito em Manaus no Brasil com o propósito de investigar a prevalência de algumas ISTs em mulheres com e sem sintomas, que apresentou uma prevalência de 9,2% de CT no grupo de mulheres sem sintomas e 12,5% em mulheres com algum sintoma e além disso, com coinfeção com outra IST (COSTA LIRA et al.,2017).

A infecção por CT está associada ao risco aumentado da transmissão do HIV e de outras ISTs, isso principalmente pela reação inflamatória causada pela CT que promove o acesso aos linfócitos TCD4 ao local, mostrando que apesar destas amostras serem de mulheres sem HIV, a presença de infecção mostra que estas mulheres estão propensas a novas infecções (BECKER, 2005). Diante destes dados, são necessários mais estudos para melhorar a avaliação e a prevalência de CT na população. O controle da infecção por CT é dificultado por diferentes fatores de qualidade da metodologia e da amostragem apontado como um fator imprescindível para a diminuição das taxas de infecção por CT.

CONCLUSÕES

A presença da CT, em vários estudos brasileiros, aponta sua presença através de diversas formas e sua prevalência varia conforme as diferentes populações. Neste estudo a prevalência ficou dentro da média encontrada no país e não muito diferente da encontrada em outros estudos. A detecção da doença na sua fase inicial é vital para o início de um tratamento eficiente, evitando assim a utilização inadequada de medicamentos, como também para interromper a cadeia de transmissão e dos danos por elas causados. Os testes de amplificação de DNA têm sido utilizados na rede privada para detecção de ISTs de difíceis diagnósticos, sendo que esses métodos podem facilitar também a testagem de mais de um agente ao mesmo tempo.

Este trabalho mostrou que a técnica de PCR pode ser utilizada para o diagnóstico de CT, pois neste estudo foi possível confirmar em 12% a positividade de CT. A utilização de

um teste molecular pode ser uma ferramenta de extrema importância para o diagnóstico deste agente em poucas horas.

REFERÊNCIAS

ANDRADE A.C.R. et al. Infecção genital por *Chlamydia trachomatis* na mulher: epidemiologia, diagnóstico e consequências. RFM-Revista Fluminense de Medicina - FJM - Fluminense Journal of Medicine. v.78, n.2,p15-17, 2014.

BECKER, D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por reação em cadeia da polimerase. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COSTA-LIRA, E. et al. Prevalence of *human papillomavirus*, *Chlamydia trachomatis*, and *Trichomonas vaginalis* infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology. **Genet. Mol. Res.**, Manaus, v. 16, n. 2, p. 1-11, abr 2017.

DE GOES, J. T. et al. Doenças Sexualmente Transmissíveis: Incidência em Mulheres de um Centro de Especialidade em 2009. **Rev. cient. hosp. matern.-infant. pres. Vargas**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, p. 21-36, jan/jun 2010.

DEAN, D. *Chlamydia trachomatis* today: treatment, detection, immunogenetics and the need for a greater global understanding of chlamydial disease pathogenesis. **Drugs today (Barc.)**, Barcelona, v. 45, n. Suppl B, p. 25-31, 2009.

IGANSI, C. N. Prevalência de *papilomavírus humano* (HPV) e *chlamydia trachomatis* (CT) e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre, Brasil. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

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

KAULK et al. The genital tract immune milieu: an important determinant of HIV susceptibility and secondary transmission. **J Reprod Immun.** v.77, n.1, p.32-40, 2008.

KINSSIGER et al. *Trichomonas vaginalis* treatment reduces vaginal HIV-1 shedding. **Sex Health.** v.36, n.1, p.11-16, 2009.

KECK, C. et al. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. **Hum. reprod. updat.**, Oxford, v. 4, n. 6, p. 891-903, nov/dez 1998.

KÖKSAL, M. O. et al. Prevalence and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in symptomatic male patients from Istanbul, Turkey. **SpringerPlus**, Suíça, v. 5, n. 1, p. 1706, out 2016.

LAN, J. et al. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **J. clin. microbiol.**, Washington, v. 31, n. 5, p. 1060-1065, mai 1993.

LEWIS, D. et al. The prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection in Australia: a systematic review and meta-analysis. **BMC infect. dis.**, Londres, v. 12, n. 1, p. 113, mai 2012.

MACLEOD, J.; SMITH, G. D. Chlamydia screening can have high take-up rates if right methodology is used. **BMJ**, Londres, v. 319, n. 7203, p. 188, jul 1999.

MEYER T. Diagnostic procedures to detect Chlamydia trachomatis infections. 2016 acessada em 2/2017. www.mdpi.com/journal/microorganisms .

MIRANDA, A. E. et al. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea* and associated factors among women living with *Human Immunodeficiency Virus* in Brazil: a multicenter study. **Braz. j. infect. dis.**, Salvador, v. 21, n. 4, p. 402-407, jul/ago 2017.

PIAZZETTA, S. R. C. P. et al. 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.**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 11, p. 328-333, 2011.

PROTO, I. A. C. et al. Prevalência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres submetidas à fertilização assistida em Goiânia. **Reprod. clim.**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 108-111, set/out 2013.

ROSHANI, D. et al. A PRISMA systematic review and meta-analysis on *Chlamydia trachomatis* infections in Iranian women (1986–2015). **Medicine**, Baltimore, v. 97, n. 16, abr 2018.

SILVA, L. C. Doenças Sexualmente transmissíveis em mulheres infectadas por HIV ou portadoras de AIDS, atendidas em serviço de assistência especializada em HIV/AIDS do Amazonas: infecção por *clamídia trachomatis*, *trichomonas vaginalis e Papilomavirus Humano*. Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em medicina tropical da Universidade do Estado do Amazonas, Manaus. 2014.

SOMANI, J. et al. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. **J. Infect. Dis.**, Estados Unidos, v. 181, n. 4, p. 1421-1427, abr 2000.