

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**DETECÇÃO DE *Chlamydia trachomatis* EM AMOSTRAS  
CERVICAIS POR REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Dissertação de Mestrado

DANIELA BECKER

Porto Alegre, 2005.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**DETECÇÃO DE *Chlamydia trachomatis* EM AMOSTRAS  
CERVICAIS POR REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre.

DANIELA BECKER

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2005.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul-Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre-Rio Grande do Sul, Brasil.

**Certeza**

*De tudo ficaram três coisas:  
A certeza de estar sempre começando...  
A certeza de que é preciso continuar...  
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...  
Fazer da interrupção um caminho novo...  
Fazer da queda um passo de dança...  
Do medo, uma escada...  
Do sonho, uma ponte...  
Da procura, um encontro...*

**Fernando Sabino**

Dedico este trabalho a minha filha Laura,  
que no seu jeito de criança tem me ensinado a viver.

## **AGRADECIMENTOS**

À Dra. Maria Lúcia Rossetti, por haver plantado em mim a primeira semente de incentivo à pesquisa aplicada, por oportunizar a realização deste trabalho, sobretudo pela confiança e amizade depositadas.

À Dra. Marilene Henning Vainstein por oportunizar meu retorno aos estudos, valorizando a formação do pesquisador profissional de Saúde Pública. Obrigada pela confiança, paciência e incentivo.

À Coordenação do Estudo de Prevalências e Frequências Relativas das DST no Brasil, na figura do Dr. Fábio Moherdau, que disponibilizou rico material para a realização deste trabalho. À Letícia Nolde Mello e à Simone Martini de David, pelos dados fornecidos.

Às colegas do CDCT por formarem essa rede de cooperação mútua tão saudável, onde todos ganham, pela orientação e amizade, em especial às prestativas Camile, Vivian, Ludmila, Cíntia e Lia. Aprendi muito com vocês!

Às colegas de serviço Flúvia, Marilda, Linda, Ivete, Irina e Tatiana pela compreensão e incentivo nessa caminhada de todas nós.

À inestimável amiga Alzira, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo otimismo e perseverança ao encarar os problemas.

Às estagiárias Lívia e Naíla pelo auxílio valoroso e competente no laboratório.

Aos colegas do Centro de Biotecnologia, em especial ao César, pela atenção em alguns momentos deste trabalho.

À minha família, pelo incentivo e apoio, sempre.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 BIOLOGIA.....	14
1.2 <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> .....	17
1.2.1 Aspectos Gerais.....	17
1.2.2 Epidemiologia.....	19
1.2.3 Manifestações Clínicas.....	21
1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO POR <i>C. TRACHOMATIS</i> .....	23
1.3.1 Coleta e Transporte de Amostras Clínicas.....	23
1.3.2 Cultivo celular.....	24
1.3.3 Pesquisa de anticorpos específicos.....	25
1.3.4 Detecção direta de antígenos.....	26
1.3.5 Técnicas Moleculares.....	27
1.3.5.1 Hibridização com Sondas de Ácidos Nucléicos.....	27
1.3.5.2 Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucléicos.....	28
1.4 DEFINIÇÃO DE PADRÃO-OURO.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 AMOSTRAS CÉRVICO-VAGINAIS.....	36
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	36
4.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS PELO MÉTODO DE CAPTURA HÍBRIDA.....	37
4.4 SELEÇÃO DA SEQÜÊNCIA ALVO PARA AMPLIFICAÇÃO DO DNA DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> .....	37
4.5 PROTOCOLO <i>IN HOUSE</i> PARA DETECÇÃO DE <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i> .....	38
4.5.1 Extração de DNA.....	38
4.5.2 Reação de Amplificação.....	38
4.5.3 Análise dos Produtos Amplificados.....	39
4.6 HIBRIDIZAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	40

<b>4.7 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.8 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO ANALÍTICA DA PCR <i>IN HOUSE</i></b> .....	<b>41</b>
4.8.1 <i>Extração de DNA de Chlamydia trachomatis</i> .....	41
4.8.2 <i>Teste de Sensibilidade Analítica</i> .....	41
<b>4.9 CLIVAGEM ENZIMÁTICA DO PRODUTO AMPLIFICADO</b> .....	<b>42</b>
<b>4.10 SEQÜENCIAMENTO DO PRODUTO AMPLIFICADO</b> .....	<b>42</b>
<b>4.11 ANÁLISE DE AMOSTRAS PELO SISTEMA COBAS AMPLICOR</b> .....	<b>43</b>
<b>4.12 CLONAGEM DO FRAGMENTO DE 201PB DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.13 TESTE DE INIBIÇÃO DA PCR</b> .....	<b>44</b>
<b>4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>44</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
<b>5.1 AMPLIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DE EBS DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS</b> .....	<b>45</b>
<b>5.2 CONFIRMAÇÃO DA SEQÜÊNCIA AMPLIFICADA</b> .....	<b>45</b>
<b>5.3 DETERMINAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DOS PRIMERS</b> .....	<b>47</b>
<b>5.4 ADEQUAÇÃO DA TEMPERATURA DE ANELAMENTO</b> .....	<b>47</b>
<b>5.5 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>5.6 ANÁLISE DAS AMOSTRAS CLÍNICAS</b> .....	<b>50</b>
<b>5.7 RESULTADOS DE OUTRAS ANÁLISES LABORATORIAIS</b> .....	<b>56</b>
<b>5.8 ANÁLISE DOS DADOS PESSOAIS</b> .....	<b>58</b>
<b>5.9 ANÁLISE DOS CUSTOS E TEMPO DE EXECUÇÃO DAS TÉCNICAS EMPREGADAS NO ESTUDO</b> .....	<b>60</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	<b>69</b>
<b>8. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>71</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>72</b>
<b>10. ANEXOS</b> .....	<b>80</b>
<b>10.1 SOLUÇÕES E TAMPÕES</b> .....	<b>81</b>
<b>10.2 MANUSCRITO</b> .....	<b>82</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES**

°C	graus Celsius
μL	microlitros
μm	micrometros
ATP	trifosfato de adenosina
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CTAB	brometo de cetil trimetil amônio
DFA	Imunofluorescência Direta
DIP	doença inflamatória pélvica
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNTP	desoxinucleosídeo trifosfato
DP	desvio padrão
DST	doenças sexualmente transmissíveis
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético
EIA	Enzimaimunoensaio
FC	Fixação do Complemento
FDA	Food and Drug Administration
fg	fentogramas
h	horas
IPTG	isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
HIV	vírus da imuno deficiência adquirida
HPV	Papilomavírus Humano
LPS	lipopolissacarídeo
M	Molar
MAmp	miliampere
mg	miligrama
MIF	Microimunofluorescência
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar

MOMP	<i>major outer membrane protein</i> ou proteína majoritária de membrana
NAATs	testes de amplificação de ácidos nucleicos
ng	nanogramas
nm	nanômetros
ORF	<i>open reading frame</i> ou fase de leitura aberta
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ou Reação em Cadeia da Polimerase
PMN	polimorfonucleares
pmol	picomol
RLU	Unidade relativa de luminescência
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
s	segundos
SD	Standard deviation
TEB	Tris borato-EDTA
UFI	unidade formadora de inclusão
UV	ultra-violeta
V	Volts
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -galactopiranosídeo
W	Watts

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ciclo de desenvolvimento das clamídias.	15
<b>Figura 2.</b>	Classificação taxonômica das clamídias.	16
<b>Figura 3.</b>	Limites de detecção relativos das diferentes metodologias utilizadas no diagnóstico da infecção por <i>Chlamydia trachomatis</i> .	29
<b>Figura 4.</b>	Análise eletroforética do produto de PCR após clivagem com EcoRV.	46
<b>Figura 5.</b>	Alinhamento da seqüência de 201pb com a seqüência depositada do plasmídio LGV 440 de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	46
<b>Figura 6.</b>	Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% do teste de especificidade dos <i>primers</i> utilizados.	47
<b>Figura 7.</b>	Teste de especificidade dos <i>primers</i> com temperatura de anelamento de 64°C.	48
<b>Figura 8.</b>	Teste de especificidade dos <i>primers</i> com temperatura de anelamento de 66°C.	49
<b>Figura 9.</b>	Teste de sensibilidade analítica da PCR.	50
<b>Figura 10.</b>	Análise eletroforética dos produtos de PCR obtidos com os <i>primers</i> CTP1/CTP2 a partir de amostras cérvico-vaginais.	51
<b>Figura 11.</b>	Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR obtidos após reação com os <i>primers</i> CTP1/CTP2 em teste de inibição da reação.	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Doenças humanas causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i> .	18
<b>Tabela 2.</b>	Comparação entre os resultados obtidos nas metodologias utilizadas para a detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> nas amostras clínicas.	52
<b>Tabela 3.</b>	Resultados das análises individuais das amostras cérvico-vaginais utilizadas no estudo.	53
<b>Tabela 4.</b>	Comparação entre os resultados obtidos na análise por PCR COBAS Amplicor.	56
<b>Tabela 5.</b>	Comparativo entre os resultados obtidos nas metodologias utilizadas com a análise bacterioscópica.	57
<b>Tabela 6.</b>	Presença de outros agentes etiológicos nas amostras cérvico-vaginais analisadas.	58
<b>Tabela 7.</b>	Freqüências relativas da escolaridade nas populações de mulheres com sinais e/ou sintomas de DST (CDST) e gestantes (CPN).	59
<b>Tabela 8.</b>	Freqüências relativas da renda familiar nas populações de mulheres com sinais e/ou sintomas de DST (CDST) e gestantes (CPN).	59
<b>Tabela 9.</b>	Freqüências relativas da situação marital nas populações de mulheres com sinais e/ou sintomas de DST (CDST) e gestantes (CPN).	60
<b>Tabela 10.</b>	Freqüências relativas a etnia/cor verificada nas populações de mulheres com sinais e/ou sintomas de DST (CDST) e gestantes (CPN).	60
<b>Tabela 11.</b>	Comparativo entre custos de testes e tempo de execução das técnicas empregadas nesse estudo para detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	61

## RESUMO

*Chlamydia trachomatis* é o agente causal de uma das infecções sexualmente transmissíveis (IST) mais prevalentes da atualidade. Os maiores problemas no controle desta IST estão no caráter assintomático da infecção e no seu difícil diagnóstico laboratorial. Com o advento dos testes moleculares, grandes avanços ocorreram na área do diagnóstico laboratorial da infecção clamidial. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver um método de detecção de *C. trachomatis* por PCR a partir de amostras cérvico-vaginais. A seqüência alvo escolhida para amplificação consiste de um segmento da ORF 4 do plasmídio críptico de ocorrência natural nesta bactéria. Noventa e duas amostras cérvico-vaginais foram submetidas ao protocolo de PCR *in house* proposto. Os produtos de PCR foram detectados por visualização direta após eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio e por exposição radiográfica após hibridização com sonda homóloga. As amostras foram testadas paralelamente pelo método de captura híbrida para detecção de *C. trachomatis*. O kit COBAS Amplicor (Roche) foi utilizado para resolver resultados discrepantes. A seqüência do fragmento de 201pb foi confirmada por clivagem enzimática e por seqüenciamento. O teste de especificidade dos *primers* confirmou especificidade dos mesmos frente ao DNA de diferentes agentes patogênicos e da flora normal feminina. Do total de amostras analisadas, 50 foram positivas por captura híbrida, 51 foram positivas por PCR *in house* e 67 positivaram após hibridização. O teste de McNemar indicou haver concordância entre os métodos analisados dois a dois ( $P < 0,001$ ). Verificou-se concordância moderada nos comparativos entre captura híbrida e PCR (valor de Kappa: 0,45; DP 0,093), captura híbrida e hibridização (valor de kappa: 0,389; DP 0,091) e, PCR e hibridização (valor de Kappa: 0,634; DP 0,077). O método de PCR *in house* proposto para a detecção de *C. trachomatis* é uma técnica rápida e de baixo custo para o diagnóstico, controle e monitoramento dos casos da infecção. Estudos complementares, no entanto, são necessários para implementação deste teste em laboratórios da rede pública.

## ABSTRACT

*Chlamydia trachomatis* is nowadays one of the most prevalent sexually transmitted diseases (STD). The biggest challenges in the control of this STD are the asymptomatic character of the infection and its difficult laboratory diagnostic. The advent of molecular tests gave substantial advances in the clamidial laboratory diagnosis. The aim of this work was to develop a PCR method for the detection of *C. trachomatis* in cervical specimens. The amplification target sequence was a 201bp segment of the ORF 4 of the cryptic plasmid of *C. trachomatis*. Ninety-two cervical specimens were submitted to the proposed protocol. Amplification products were detected by gel electrophoresis ethidium bromide staining and by radiographic exposition after hybridization with homologous probe (HYBR). Specimens were tested in parallel by Hybrid Capture II kit (Digene)(HC). The COBAS amplicor kit (Roche) was used to resolve discrepant results. Enzymatic cleavage and automatic sequencing confirmed the 201bp sequence. Specificity test confirmed specific annealing of the primers. Fifty specimens gave positive results by HC, whereas PCR and HYBR detected, respectively, 51 and 67 positive specimens. All specimens PCR positive gave positive results by HYBR. The concordance between HC and PCR; HC and HYBR; PCR and HYBR was moderated: 0.45 (SD 0.093), 0.39 (SD 0.091), 0.634 (SD 0.077). The two-sided McNemar test indicated concordance between all methods ( $P < 0.001$ ). The results show that the in house plasmid-based PCR is rapid, cheap, relatively sensitive and specific test for the detection of *C. trachomatis* DNA in cervical specimens. Complementary studies are necessary to implement the test in a public health laboratory routine.

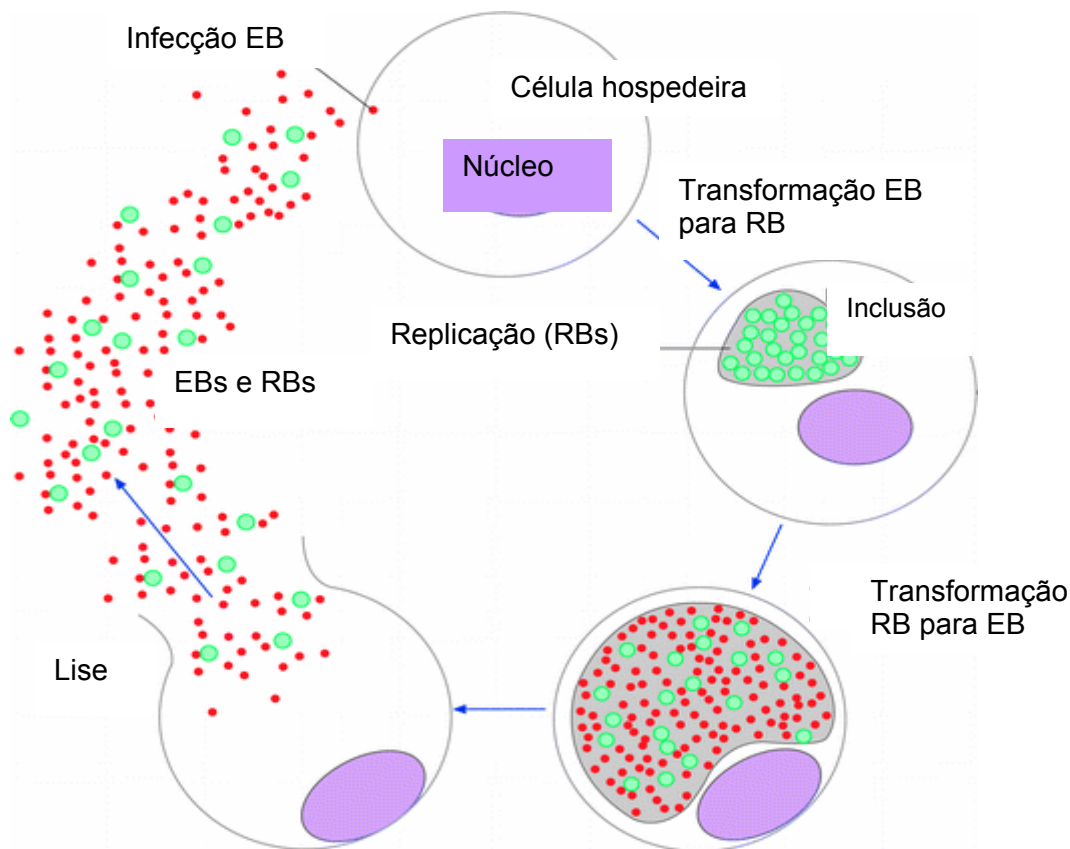
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Biologia

Clamídias são um grupo de bactérias patogênicas, evolutivamente distinto de eubactérias (Moulder, 1984; Pudjiatmoko *et al.*, 1997), com parede celular semelhante a das bactérias gram-negativas, não-móveis e parasitas intracelulares obrigatórios amplamente distribuídas em todo o reino animal. Infectam desde protistas a células da microglia cerebral (Black, 1997). Apesar de apresentarem vias metabólicas para síntese de ATP, são consideradas parasitas energéticos, pois utilizam ATP produzido pelas células do hospedeiro (Black, 1997; Mahony *et al.*, 2003).

O ciclo de desenvolvimento das clamídias é único e as diferencia de todos os outros microrganismos (Moulder, 1984), constituindo-se na base para sua classificação taxonômica na ordem *Chlamydiales* (Mahony *et al.*, 2003). Inicialmente, o corpúsculo elementar (*Elementary body*, EB), partícula infecciosa metabolicamente inativa, penetra a célula em um endossoma, dentro do qual todo o ciclo de desenvolvimento é completado. O EB (0,25 a 0,35µm) interiorizado reorganiza-se em corpúsculo reticular (*Reticulate body*, RB, 0,5-1,0 µm) que é a partícula metabolicamente ativa, porém não infecciosa. Após aproximadamente 8 horas, o corpúsculo reticular começa a dividir-se por fissão binária. Após 18 a 24 horas após infecção, os RBs gerados reorganizam-se em EBs, num processo de condensação pouco compreendido. Os EBs formados são então liberados para dar início a um novo ciclo infeccioso (Figura 1). Os EBs são a forma infectiva das clamídias, especificamente adaptados ao meio extracelular. A forma metabolicamente ativa, RB não resiste fora da célula hospedeira e parece adaptada ao meio intracelular (Schachter & Stamm, 1999).

Sob condições adversas, de exaustão de nutrientes ou de concentração sub-ótima de antibióticos, as clamídias assumem a forma de corpúsculo persistente (*Persistent body*, PB), não replicativa e que contribui para a sobrevivência desta no meio intracelular (Mahony *et al.*, 2003; Hogan, 2004).

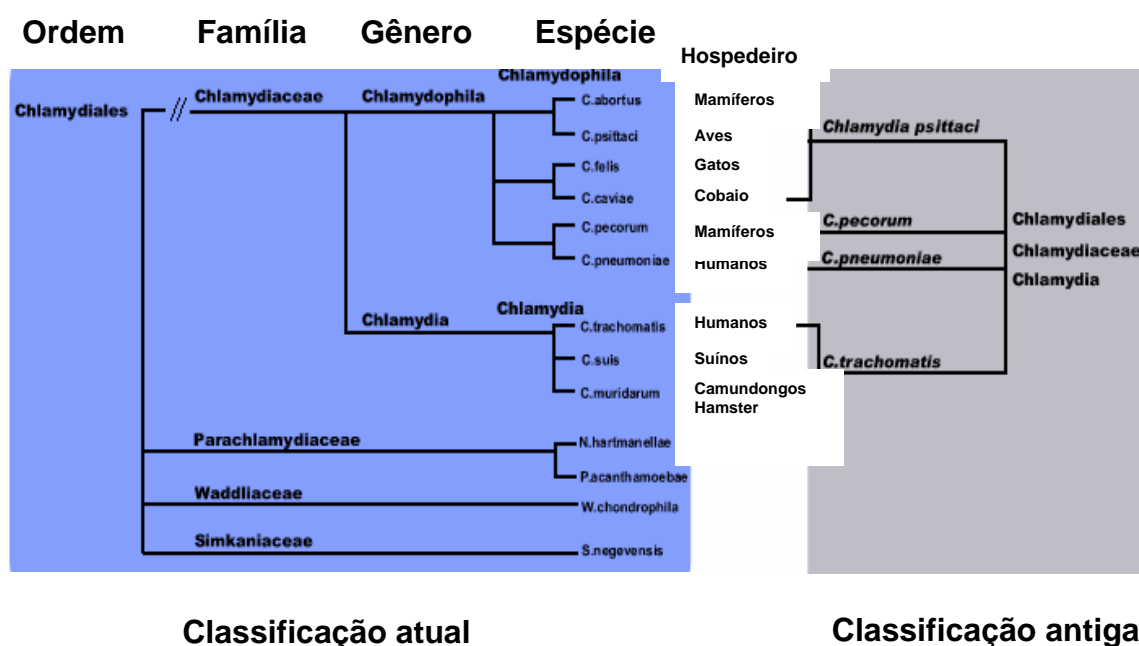


**Figura 1. Ciclo de desenvolvimento das clamídias.** Adaptado de [www.chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html](http://www.chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html) - EB: corpúsculo elementar; RB: corpúsculo reticular.

Historicamente, todas as clamídias foram classificadas em uma única ordem, *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, dentro de um único gênero, *Chlamydia* (Moulder, 1984; Pudjiakmoto *et al.*, 1997) com quatro espécies reconhecidas: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psitacci*, *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia pecorum*. Entretanto, análises mais recentes de seqüências de rRNA 16S e 23S, demonstraram a necessidade de uma nova classificação taxonômica (Everett *et al.*, 1999). A nova classificação taxonômica propôs que a ordem *Chlamydiales* fosse subdividida em quatro famílias: (1) *Chlamydiaceae*, contendo dois gêneros, *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. muridarum* e *C. suis*) e *Chlamydophila* (incluindo *Cph. pneumoniae*, *Cph. pecorum*, *Cph. abortus*, *Cph. caviae* e *Cph. felis*); (2) *Simkaniaceae*, para incluir *Simkania negevensis*; (3) *Parachlamydiaceae*, para incluir *Parachlamydia*



*acanthamoeba* e (4) *Waddliaceae* para incluir *Waddlia chondrophila* (Figura 2) (Mahony *et al.*, 2003; Corsaro *et al.*, 2003). De acordo com a nova classificação as espécies *C. trachomatis*, *Cph. psittaci*, *Cph.abortus*, *Cph. felis* e *Cph. pneumoniae* são patogênicas para os humanos, enquanto que as espécies *P. acanthamoebae* e *S. negevensis* são consideradas patógenos humanos emergentes e estariam associadas a infecções respiratórias (Corsaro *et al.*, 2003).



**Figura 2. Classificação taxonômica das clamídias.** Adaptado de [www.chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html](http://www.chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html)

A infecção humana causada por *C. psittaci*, a psitacose, tem origem na exposição a aves infectadas e caracteriza-se por um quadro respiratório, podendo evoluir para pneumonia ou infecção sistêmica, incluindo endocardite. *C. pneumoniae* é responsável por infecções que variam de faringite autolimitada à pneumonia fatal. É a maior causa de pneumonia comunitária e há indícios de correlação com aterosclerose e doença coronariana arterial. *C. trachomatis*

ocasiona infecção ocular, respiratória e do trato genital (Francisco, 1996; Black, 1997; Warford *et al.*, 1999).

As clamídias apresentam tanto antígenos comuns entre as espécies como antígenos espécie-específicos. O antígeno majoritário comum a todas as clamídias, é quimicamente um lipopolissacarídeo (LPS) que apresenta um resíduo de ácido cetodeoxioctanóico reativo. *C. trachomatis* e *C. psittaci* possuem antígenos tipo-específico, o que permite definir biotipos e sorotipos para estas espécies. A proteína de membrana majoritária (MOMP, *major outer membrane protein*), codificada pelo gene *OmpA* de *C. trachomatis*, apresenta heterogeneidade antigênica, permitindo sorotipagem do microrganismo pela técnica de microimunofluorescência (Mahony *et al.*, 2003).

## **1.2 *Chlamydia trachomatis***

### **1.2.1 Aspectos Gerais**

A espécie *C. trachomatis* está dividida em 15 sorotipos agrupados em 3 biotipos com base em diferenças biológicas (Tabela 1). A infecção por *C. trachomatis* é a doença sexualmente transmissível bacteriana mais comum. (Black, 1997; Mahony *et al.*, 2003). Os sorotipos A, B, Ba e C são associados com tracoma endêmico, forma mais comum de cegueira cuja prevenção é possível, enquanto que os sorotipos L1, L2 e L3 estão associados ao linfogranuloma venéreo. Os sorotipos D à K são os responsáveis pela uretrite não-gonocócica e epididimite em homens e podem induzir síndrome de Reiter, proctite e conjuntivite tanto em mulheres quanto em homens. Em mulheres, estes sorotipos causam cervicite, uretrite, endometrite, salpingite e peri-hepatite. *C. trachomatis* pode ser transmitida ao feto durante o parto vaginal, resultando em pneumonia neonatal. Infecções vaginais, faringiais e entéricas também já foram relatadas em neonatos (Mahony *et al.*, 2003; Francisco, 1996).

O genoma de *C. trachomatis* é formado por um cromossomo circular, com 1.042.519 bp (58,7% de A-T) e um plasmídeo com 7493 pb (número de acesso no Gen Bank AE001273). O genoma clamidial codifica para aproximadamente

875 proteínas, das quais setenta são exclusivas da espécie *C. trachomatis*. Até o momento foram seqüenciados os genomas dos sorotipos D, B e L2, de *C. trachomatis* (Stephens, 1998; *Chlamydia* Genome Project.<http://chlamydia.Berkeley.Edu:4231/index.html>).

O plasmídio críptico de *C. trachomatis* sorotipo D apresenta 8 ORFs (fases de leitura aberta) intercaladas por quatro seqüências curtas não codificantes de 22 pb em *tandem*. Os genomas das espécies de clamídias apresentam baixa homologia entre si e seus plasmídios podem ser distinguidos por *Southern-blotting* e por mapeamento com enzimas de restrição. Todos os plasmídios de isolados de *C. trachomatis*, por sua vez, são extremamente conservados, com menos de 1% de variação na seqüência nucleotídica (Thomas *et al.*, 1997).

**Tabela 1.** Doenças humanas causadas por *Chlamydia trachomatis*.

Sorotipo	Sexo	Doenças
A,B,Ba,C	Ambos	Tracoma, conjuntivite, queratite, uretrite
	Feminino	Uretrite não gonocócica, cervicite, endometrite, salpingite, peri-hepatite
D,E,F,G,H,I, J,K	Masculino	Uretrite não gonocócica, prostatite, epididimite
	Ambos	Conjuntivite, proctite, síndrome de Reiter
	Recém-nascidos	<i>Oftalmia neonatorum</i> , pneumonia
L1, L2, L3	Ambos	Linfogranuloma venéreo

Adaptado de Francisco, 1996.

Isolados clínicos de *C. trachomatis* que não apresentam plasmídio, embora raros, já foram caracterizados (Farencena *et al.*, 1997; Miyashita *et al.*, 2001). Observou-se que o padrão de susceptibilidade a antibióticos por linhagens de *C. trachomatis* com e sem plasmídio não difere, o que demonstra que este não contribui na transferência de resistência. Por outro lado, linhagens

de *C. trachomatis* que não apresentam plasmídeo diferenciam-se das demais pela morfologia não usual das inclusões e pela ausência de glicogênio (Miyashita *et al.*, 2001). A existência de linhagens livres de plasmídeo demonstra que este não é essencial para a sobrevivência do microrganismo. É provável que a eficiente conservação desta estrutura na evolução de *C. trachomatis* seja devida a alguma vantagem que a mesma confere, e que esteja associada a alguma das regiões ainda não identificadas das ORFs ([www.chlamydia – www.berkeley.edu:4231/index.html](http://www.chlamydia-berkeley.edu:4231/index.html)).

### 1.2.2 Epidemiologia

*C. trachomatis* é o agente causador da infecção sexualmente transmissível (IST) de etiologia bacteriana mais comum (Francisco, 1996; Black, 1997; Warford, 1999). Devido à natureza assintomática da infecção clamidial, dados de prevalência e incidência são pouco precisos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram anualmente 90 milhões de casos, sendo 9,5 milhões somente na América Latina e Caribe ([www.who.int/hiv-aids/grsti/002.htm](http://www.who.int/hiv-aids/grsti/002.htm)).

Nos Estados Unidos, desde 1990 vigora a lei de notificação compulsória de casos de infecção por *C. trachomatis*. No ano de 2002, foram reportados 834.555 casos (296,5 casos / 100.000 habitantes). Se o aumento do número de casos reportados, ano após ano desde 1987 reflete, por um lado, a expansão dos programas de triagem e de notificação naquele país e o desenvolvimento e o uso de testes diagnósticos mais sensíveis, verifica-se por outro lado, que as taxas de infecção permanecem altas (CDC, STD Surveillance, 2002).

No Brasil a infecção clamidial não é uma doença de notificação compulsória. Alguns estudos de prevalência vem sendo conduzidos isoladamente em populações específicas, utilizando-se testes moleculares para a detecção de *C. trachomatis*, os quais permitem a realização de triagens populacionais. Ramos e colaboradores (2003) realizaram um estudo de base populacional em mulheres residentes em uma vila popular da cidade de Porto

Alegre (RS), que revelou uma baixa prevalência, da ordem de 0,59%. O mesmo grupo, no entanto, pesquisando 79 pacientes masculinos de uma clínica de DST, obteve positividade para *C. trachomatis* em 41,9% dos casos (Ramos *et al.*, 2002). Um outro estudo de base populacional realizado na cidade de Vitória (ES) em mulheres adolescentes sexualmente ativas constatou a prevalência de 12,2% neste grupo (Miranda *et al.*, 2004). A prevalência estimada em 121 amostras de pacientes femininas, usuárias de um serviço de DST na cidade de Manaus foi de 20,7% (Santos *et al.*, 2003). Está em andamento no país um estudo em âmbito nacional de prevalências e freqüências relativas das principais doenças sexualmente transmissíveis (DST). Os resultados parciais estimam a prevalência de infecção por *C. trachomatis* em mulheres sexualmente ativas da ordem de 2,2%. Em homens, esta prevalência seria 4,5% e em gestantes de 6,3% (dados não publicados, fonte: Ministério da Saúde).

O grupo demográfico mais freqüentemente acometido pela infecção clamidial é o de mulheres sexualmente ativas com menos de 20 anos. A prevalência nestes grupos excede os 10% podendo chegar a 40% em clínicas de DST que atendem garotas adolescentes. Acredita-se que a base biológica para esta associação seja diferenças anatômicas na cérvice uterina de mulheres jovens, o que favorece a exposição ao agente. Outros fatores demográficos incluem nuliparidade, *status* de solteiro, etnia negra e baixa condição sócio-econômica. O grande número de parceiros sexuais, um novo parceiro sexual, o não uso de preservativo e a infecção gonocócica concomitante também são fatores consistentes na associação com a infecção clamidial (Black, 1997). A prevalência de casos diagnosticados de infertilidade tubária por *C. trachomatis* pode estar associada a tendência ocidental feminina de postergar a gravidez. Assim há um espaço de tempo considerável entre a doença inflamatória aguda primária e a busca por serviços médicos por dificuldades em engravidar (Mardh, 2004).

A prevalência da infecção por *C. trachomatis* varia de 4 a 10% em homens assintomáticos e de 15% a 20% em pacientes masculinos de clínicas de DST. A infecção em neonatos ocorre como resultado da exposição perinatal, acometendo 65% dos recém-nascidos, durante o parto vaginal (Black, 1997).

Infecções por *C. trachomatis* estão associadas ao risco aumentado de transmissão do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV). Isto se dá pela reação inflamatória causada pela infecção clamidial que promove o acesso de linfócitos CD4 (alvo do vírus HIV) ao local. A concomitância de infecção clamidial e pelo HIV também resulta em aumento da replicação viral (Mahony *et al.*, 2003). De um modo geral, infecções do trato genital aumentam o risco de aquisição do HIV e outras DST em cerca de 10 vezes. Por outro lado, a prevenção e tratamento das DST podem reduzir a infecção pelo HIV em 40% (Dallabetta, 1996; Black, 1997).

O maior desafio no controle da infecção clamidial está no fato de que 70 a 80% das mulheres e até 50% dos homens que estão infectados não experimentam nenhum sintoma. Isto resulta em grandes reservatórios de indivíduos infectados, passíveis de transmitir a infecção a seus parceiros sexuais. Contribui para isso o fato de a imunidade desenvolvida com a infecção ser apenas parcialmente protetora, sendo a recorrência muito comum (Black, 1997; Mahony *et al.*, 2003).

### **1.2.3 Manifestações Clínicas**

O maior impacto da infecção clamidial se dá no aparelho reprodutor feminino (Black, 1997). Embora a maior parte das infecções causadas por *C. trachomatis* em mulheres sejam assintomáticas, pode ocorrer manifestações clínicas como cervicite, uretrite e endometrite, doença inflamatória pélvica (DIP) ou abscesso das glândulas de Bartholin. Paradoxalmente, as infecções clamidiais causam mais imunopatologias tubárias severas do que outros agentes, apesar da sintomatologia não declarada (Francisco, 1996; Black, 1997; Warford *et al.*, 1999).

O sítio de infecção inicial é a cérvix, porém esta pode acometer uretra e o reto. A DIP, resultante da infecção ascendente não tratada, ocorre em cerca de 40% dos casos. Dos casos de DIP, 20% evoluem para esterilidade, 18% apresentam dor pélvica crônica e 9% tem episódio de gravidez tubária (MMWR, CDC, 2002). A salpingite, infecção das trompas de Falópio, é atualmente reconhecida como a maior causa de infertilidade e de gravidez ectópica (Warford

et al., 1999; Mardh, 2004). Mais de 50% das mulheres com oclusão tubária apresentam evidência sorológica de infecção prévia por *C. trachomatis* (Warford, 1999). A infecção tubária persistente é comum, mesmo após a antibioticoterapia. Fatores imunopatológicos do hospedeiro estariam associados à evolução para doença inflamatória pélvica (Mardh, 2004).

Os sintomas, quando ocorrem, são corrimento vaginal e disúria. Na vigência de DIP, os sintomas podem ser ausentes ou súbitos, caracterizados por dor uterina ou pélvica. Os sinais clínicos são cervicite mucopurulenta, friabilidade cervical, piúria com cultura negativa e mais de dez leucócitos polimorfonucleares (PMNs) por esfregaço de Gram (Black, 1997). O sintoma predominante na vigência de peri-hepatite é a dor abdominal superior. Esta condição ocorre quase que exclusivamente em mulheres cujo agente infeccioso espalhou-se para a superfície do fígado a partir das trompas de falópio inflamadas (Warford, 1999).

A infecção em gestantes varia de 2 a 35% e estas apresentam risco aumentado de natimortos e de morte neonatal, assim como de DIP no pós-parto. Os períodos gestacionais também são significativamente mais curtos na vigência de infecção. A infecção por *C. trachomatis* é a causa mais comum de conjuntivite neonatal e uma das causas mais comuns de pneumonia na primeira infância (Black, 1997).

No homem, a infecção por *C. trachomatis* causa uretrite e, ocasionalmente, epididimite. Os sintomas, quando ocorrem, são indistinguíveis dos da gonorréia (corrimento uretral e/ou piúria). Trinta a 50% dos casos de uretrite não-gonocócica em homens são causados por *C. trachomatis* e esta é duas vezes mais freqüente do que a infecção por *Neisseria gonorrhoeae*. O diagnóstico presuntivo da uretrite é feito pela história do paciente, presença de corrimento uretral, presença de quatro ou mais PMNs no esfregaço de Gram e piúria notada na urinálise (Francisco, 1996; Black, 1997; Warford, 1999). A epididimite, infecção dos ductos espermáticos dos testículos, quando causada por *C. trachomatis*, é mais freqüente em homens sexualmente ativos com menos de 35 anos. Esta se desenvolve devido à infecção uretral ascendente (Black, 1997). Infecções não tratadas podem levar a síndrome de Reiter (Black, 1997).

que clinicamente manifesta-se com envolvimento do sistema articular, cutâneo-mucoso e ocular e é considerada a causa mais comum de artrite em pacientes jovens (Sousa *et al.*, 2003).

Cerca de 4 a 8% dos homossexuais masculinos apresentam infecção clamidial no reto, sendo a maioria assintomática. Os sintomas de infecção retal, tanto em homens como em mulheres que praticam sexo anal passivo, são corrimento retal e dor durante a defecação (Black, 1997).

### **1.3 Diagnóstico Laboratorial da Infecção por *C. trachomatis***

#### **1.3.1 Coleta e Transporte de Amostras Clínicas**

*C. trachomatis* é um agente intracelular obrigatório, e assim, a coleta deve objetivar pela obtenção de células do hospedeiro que abriguem o microrganismo. Amostras contendo secreções ou exsudato que carecem de células infectadas (células colunares uretrais ou endocervicais) não são satisfatórias. Testes mais sensíveis como as tecnologias de amplificação de ácidos nucléicos não requerem EBs intactos uma vez que teoricamente apenas umas poucas cópias de genes podem ser detectadas (Black, 1997).

As clamídias são bactérias relativamente lábeis e a viabilidade destas pode ser mantida conservando-se a amostra clínica refrigerada e minimizando-se o tempo entre coleta e processamento no laboratório. A realização do cultivo celular de *C. trachomatis* é recomendada exclusivamente com amostras de sítios de infecção como a endocérvice, a uretra anterior masculina e a conjuntiva. Secreções abundantes e corrimentos devem ser retirados antes da coleta a fim de eliminarem-se agentes contaminantes ou inibidores. Para envio e conservação, a amostra é colocada em meios de transporte específicos (Black, 1997; Stary, 1999; Mahony *et al.*, 2003).

A coleta e o transporte de amostras para o diagnóstico de *C. trachomatis* por métodos comerciais não cultiváveis devem seguir as instruções do fabricante. Estes geralmente seguem as instruções usadas pelos métodos de cultivo celular. Com o advento dos testes combinados para infecções por *C.*



*trachomatis* e *N. gonorrhoeae* uma única amostra endocervical ou uretral permite a realização de ambos os testes (Black, 1997).

O desenvolvimento dos métodos de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs) para detecção de infecção por *C. trachomatis* trouxe uma série de facilidades na obtenção e encaminhamento de amostras clínicas para diagnóstico. Amostras obtidas de forma não invasiva como a urina e o *swab* vaginal são excelentes materiais para a detecção de DNA de *C. trachomatis* (Mahony *et al.*, 2003). Assim, as amostras podem ser facilmente coletadas, dispensando-se o exame pélvico na mulher e o *swab* uretral no homem. *Swabs* vaginais apresentam resultados de amplificação de genes de *C. trachomatis* por PCR comparáveis aos *swabs* endocervicais (Schachter *et al.*, 2003). Da mesma forma, *swabs* coletados sem meio de transporte, demonstraram acurácia igual ao *swab* úmido para detecção de *C. trachomatis* e de *N. gonorrhoeae* por PCR. Isto abre a possibilidade da coleta pela própria paciente e envio do material via correio a centros especializados que de outra maneira ficariam inacessíveis (Gaydos & Rompalo, 2002). Um estudo realizado por Shafer e colaboradores (2003) revelou mais alta positividade para *C. trachomatis* em *swabs* vaginais autocoletados em relação aos espécimes urinários e endocervicais (Shafer *et al.*, 2003).

### 1.3.2 Cultivo celular

Durante muitos anos, a cultura bacteriológica foi considerada "padrão ouro" no diagnóstico de *C. trachomatis*. Porém, o advento das técnicas moleculares e as limitações como a labilidade de *C. trachomatis* nas amostras clínicas e variações de performance interlaboratorial do cultivo, levaram a repensar esta condição.

A cultura é realizada pela inoculação do espécime em monocamadas de cultura celular. As linhagens celulares utilizadas mais comumente são as de McCoy, BGMK e HeLa 299. O procedimento envolve a visualização, por imunofluorescência ou coloração com Giemsa ou iodo, das inclusões intracitoplásmicas após 48 a 72 horas de incubação. O uso de anticorpos

fluorescentes grupo-específicos permite uma caracterização morfológica e imunológica, constituindo-se no método de escolha para identificação de isolados de *C. trachomatis*. A sorotipagem dos isolados de *C. trachomatis* pode ser realizada com anticorpos monoclonais sorotipo-específicos ou subespécie-específicos. Vários formatos de ensaios podem ser adequados, mas o ensaio mais sensível, específico e de fácil adaptação parece ser o sistema de microplacas (CDC, MMWR, 2002; Mahony, 2003).

A visualização direta das inclusões garante especificidade próxima de 100% para a cultura. Este é, no entanto, um procedimento dispendioso, demorado (3 a 7 dias) e que requer pessoal técnico especializado, sendo atualmente restrito a laboratórios de referência. Apresenta como vantagem a preservação do microrganismo para testes de genotipagem e de sensibilidade a antimicrobianos. A sensibilidade da cultura comparada às técnicas moleculares varia de 70 a 85% (Warford *et al*, 1999).

Em casos de investigação de abuso sexual, a cultura é ainda o método indicado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) em razão dos problemas associados a resultados falsos positivos apresentados pelos métodos não cultiváveis (Warford *et al*, 1999; CDC, MMWR, 2002).

### **1.3.3 Pesquisa de anticorpos específicos**

Os métodos sorológicos utilizados para diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* são: fixação do complemento (FC), enzima imunoensaio (EIA) e micro-imunofluorescência (MIF). Estes utilizam antígenos grupo-específicos e/ou espécie-específicos para detectar imunoglobulinas de classe IgG, IgA e IgM individualmente, ou classes de imunoglobulinas.

O teste de MIF desenvolvido por Wang (1971) é o método de escolha para o sorodiagnóstico da infecção clamidial. Este permite a titulação de anticorpos reativos aos EBs clamidiais ou a antígenos individuais realizando-se a reação em lâmina de microscopia.

A natureza crônica e persistente de algumas infecções clamidiais torna difícil a detecção do aumento nos títulos de anticorpos. Grupos de indivíduos sexualmente ativos usuários de serviços de atendimento as DST são

particularmente susceptíveis a infecções crônicas e repetidas, tornando a soroconversão difícil de ser identificada (Mahony *et al.*, 2003).

A soroconversão pode levar até quatro semanas para acontecer e durante este período resultados falso-negativos podem ser obtidos. Além disso, o título de IgG só tem valor quando pareado com outro título de IgG de amostra colhida com intervalo de 30 dias, o que é inadequado em se tratando de paciente infectado que necessita de terapia imediata. Com relação aos anticorpos de classe IgM, verifica-se que pacientes previamente expostos a *C. pneumoniae* não desenvolvem IgM específicos para *C. trachomatis* (Numazaki, 1998).

Os métodos sorológicos, embora extensamente utilizados, não são recomendados para o diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* pelas razões já expostas. Estes ensaios, no entanto, encontram aplicabilidade no diagnóstico de infecção clamidial em neonatos (detecção de IgM) (Numazaki, 1998) e na investigação de infecções sistêmicas como pneumonia, linfogranuloma venéreo, fator de infertilidade tubária e gravidez ectópica, quando seus títulos apresentam-se elevados (Mahony *et al.*, 2003). Os métodos sorológicos encontram sua melhor aplicação em levantamentos epidemiológicos (Black, 1997; Warford *et al.*, 1999).

#### **1.3.4 Detecção direta de antígenos**

Os testes de detecção antigênica apresentam sensibilidade que varia entre 55 a 96% para a imunofluorescência direta (DFA) e entre 44 a 92% para ensaio imunoenzimático (EIA). Existem diversos kits comerciais disponíveis que utilizam anticorpos dirigidos a MOMP ou ao LPS. A técnica de DFA requer microscopista treinado capaz de distinguir entre partículas clamidiais e material não específico fluorescente. Ambas as técnicas necessitam de coleta contendo células epiteliais, cuja qualidade pode ser avaliada pela DFA, mas não pela EIA. Por outro lado, a EIA permite a realização de rotinas maiores e não requer o rígido treinamento do microscopista (Black, 1997; Warford *et al.*, 1999).

Além dos testes de detecção direta de antígenos usuais de *C. trachomatis* existem ainda, vários testes comerciais denominados testes rápidos, de baixo

custo, adaptados para execução fora do laboratório e para liberação imediata do resultado a fim de instituir tratamento ao paciente ainda no momento da consulta. Esses testes apresentam sensibilidade variável de 60 a 70%, comparado às técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, e especificidade inferior a 100% (Mahony *et al.*, 2003).

### 1.3.5 Técnicas Moleculares

Devido à alta prevalência da infecção clamidial, o mercado crescente e a deficiência dos métodos tradicionais de diagnóstico deste agente etiológico, um grande número de testes comerciais, que envolvem a detecção de ácidos nucleicos, têm sido desenvolvidos.

Os métodos de detecção de ácidos nucleicos têm por alvo seqüências gênicas da MOMP, do plasmídeo críptico ou do rRNA de *C. trachomatis*. Testes que utilizam genes em múltiplas cópias têm sensibilidade aumentada, como é caso do rRNA e do plasmídeo críptico de *C. trachomatis*, o qual está presente na ordem de 7 a 10 cópias por EB (Black, 1997; Warford *et al.*, 1999; [www.chlamydia-wwwberkeley.Edu:4231/index.html](http://www.chlamydia-wwwberkeley.Edu:4231/index.html)).

#### 1.3.5.1 Hibridização com Sondas de Ácidos Nucleicos

As sondas de DNA vêm sendo utilizadas por mais de dez anos em substituição aos EIAs em laboratórios de grandes rotinas. O teste mais difundido é o PACE2 (Gen-Probe, San Diego, Calif.). Este teste utiliza uma sonda de DNA quimioluminescente que hibridiza com uma seqüência espécie-específica do gene que codifica o rRNA 16S de *C. trachomatis*. Como a bactéria metabolicamente ativa apresenta mais de 1000 cópias do rRNA 16S, o teste PACE2 teria sensibilidade superior aos testes de detecção de antígeno. A sensibilidade analítica deste é de 1000 EBs. A sensibilidade clínica é similar a do melhor teste EIA. A sensibilidade do PACE2 relativa aos testes de amplificação é de 77-93% (Black & Morse, 2000).

### 1.3.5.2 Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucléicos

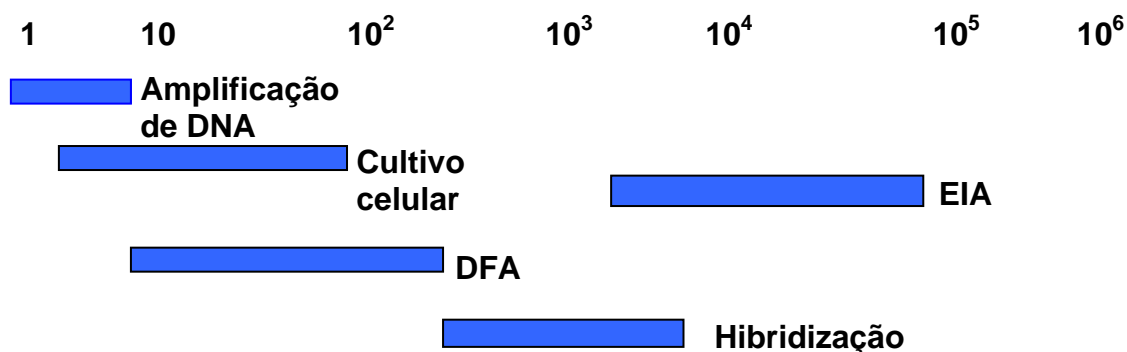
O desenvolvimento de testes baseados na tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos foi o avanço mais importante no campo do diagnóstico clamidial desde o isolamento do organismo em cultura de células *in vitro*.

A amplificação de ácidos nucleicos é extremamente sensível (capaz de detectar uma única cópia do gene) e altamente específica. Os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) detectam cerca de 20 a 30% mais infecções por *C. trachomatis* do que os métodos anteriormente descritos (Black, 1997; Mahony *et al.*, 2003). Estes testes utilizam DNA alvo presentes em múltiplas cópias por EB e, em teoria, seriam capazes de detectar menos de uma partícula clamidial (Figura 3). A sensibilidade real, no entanto, verificada em amostras clínicas, é menor em função da presença de inibidores das reações (Mahony *et al.*, 2003).

As técnicas de amplificação são classificadas de acordo com a estratégia usada para detecção, que pode ser a amplificação do sinal, do DNA alvo ou da sonda dirigida a este. Na técnica de amplificação de sinal, o aumento na sensibilidade analítica se deve ao grande número de moléculas marcadas ligadas ao ácido nucleico alvo. O teste de amplificação de sinal existente no mercado é a Captura Híbrida II (Digene, Corp., Gaithersburg, Md.).

Nas técnicas de amplificação de DNA alvo e de sondas é a própria seqüência alvo ou sonda complementar a esta, que por ação enzimática, é reproduzida em milhões de cópias. A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método base para amplificação de seqüências de DNA, mas várias outras metodologias de amplificação derivaram dela.

Existem várias publicações utilizando a tecnologia de PCR em protocolos de amplificação de ácidos nucleicos de *C. trachomatis* desenvolvidos por pesquisadores independentes. Estes protocolos são denominados *in house* ou *homebrew* e apresentam sensibilidade e especificidade variadas. São largamente empregados em razão do alto custo das metodologias de diagnóstico molecular comerciais.



**Figura 3. Limites de detecção relativos das diferentes metodologias utilizadas no diagnóstico da infecção por *Chlamydia trachomatis*.** Em escala logarítmica, o número de EBs detectável para cada método. Adaptado de Black, 1997. EB: corpúsculo elementar; DFA: imunofluorescência direta; EIA: enzima imunoensaio.

Com relação às seqüências alvo de amplificação já testadas incluem o plasmídeo críptico, genes cromossomais, como o *Omp* que codifica a MOMP, genes do rRNA e genes de proteínas ricas em cisteína (Mahony *et al.*, 1993). Um estudo realizado por Mahony e colaboradores (1993) comparou a performance de diferentes PCRs para detecção de *C. trachomatis*, incluindo PCRs dirigidos ao plasmídeo críptico, a genes da MOMP e ao rRNA. Os resultados obtidos, tanto com DNA purificado de *C. trachomatis* como com amostras genito-urinárias indicaram que PCRs baseadas no plasmídeo críptico de *C. trachomatis* são de 10 a 1000 vezes mais sensíveis do que PCRs baseados no DNA cromossomal bacteriano (Mahony *et al.*, 1993).

Cinco métodos comerciais de amplificação de ácidos nucleicos estão licenciados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para detecção de *C. trachomatis* a partir de amostras clínicas: reação em cadeia da polimerase (PCR) Amplicor (Roche Molecular Systems, Indianapolis, Inc.); reação em cadeia de ligase (LCR) LCx (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill); amplificação mediada pela transcrição (TMA) AMP-CT e, APTIMA Combo 2 (Gen-Probe); e, amplificação por deslocamento da cadeia (SDA) Probe Tec (BD Diagnostics Systems). PCR, LCR e SDA amplificam seqüências nucleotídicas do plasmídeo críptico de *C. trachomatis*. TMA está baseado na amplificação de rRNA (Black, 1997; Mahony *et al.*, 2003).

Apenas os testes de Captura Híbrida (Digene) e PCR Amplicor (Roche) serão abordados em detalhe, pois os mesmos foram utilizados no presente estudo.

O teste PCR Amplicor (Roche) emprega os *primers* biotinilados CP24 e CP27 que flanqueiam uma seqüência de 207 pb do plasmídio críptico de *C. trachomatis*. Esta seqüência localiza-se 195 pb *downstream* do sítio único de restrição de BamHI (Loeffelholz *et al.*, 1992). O teste utiliza desoxi-uracila no lugar de desoxi-timidina. Todos os produtos amplificados pela reação de PCR neste sistema contêm uracila. A adição da enzima uracil-N-glicosilase elimina DNAs contaminantes que contenham uracila substituindo timidina antes do início da amplificação. Este teste apresenta um controle interno que consiste de uma seqüência aleatória de DNA e uma fita de DNA recombinante com sítios de ligação homólogos aos *primers* do plasmídio de *C. trachomatis*. A utilização de um controle interno também tende a minimizar a interpretação de resultados falso-negativos determinados pela presença de inibidores da reação. O teste PCR Amplicor está disponível na versão semi-automatizada (COBAS Amplicor) onde as etapas de amplificação e detecção foram automatizadas. A sensibilidade e especificidade verificadas tanto em amostras urogenitais como em urina é de 90% a 99-100%, respectivamente. Amplicor está validado para o uso em amostras cervicais, uretrais masculinas e urinárias masculinas e femininas. Com estes atributos, o sistema de PCR COBAS Amplicor oferece um método acurado e confiável, pois elimina boa parte das preocupações acerca de resultados falso-positivos pelas contaminações originadas por amplicons (Livengood & Wrenn, 2001).

O teste denominado Captura Híbrida II (Digene) é um ensaio baseado em sonda de RNA e na amplificação do sinal de detecção. A sonda de RNA é homóloga à seqüência completa do plasmídio críptico de *C. trachomatis* (7500 pb) e a aproximadamente 39000 pb do genoma de *C. trachomatis* (4%). O híbrido DNA-RNA é capturado por anticorpos específicos conjugados a fosfatase alcalina. A geração do sinal se dá pela clivagem de um substrato quimioluminescente pela enzima. A amplificação substancial do sinal é atingida porque várias moléculas de fosfatase alcalina são conjugadas a cada anticorpo

e estes, ligam-se, por sua vez em grande número ao híbrido DNA-RNA. O limite de detecção do teste de Captura Híbrida para *C. trachomatis* (HC II CT-ID) varia de 50 a 2500 EBs para os 15 sorotipos (Girdner *et al.*, 1999).

O teste apresenta-se em três diferentes formatos: HC II CT/NG que é o teste de triagem e não diferencia *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*; HC CT ID que é o teste específico para *C. trachomatis*, e HC GN ID que é o teste específico para *N. gonorrhoeae*. Já existe no mercado a segunda geração deste protocolo que emprega um sistema semi-automatizado, porém apenas, a apresentação manual, tem aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) (van Der Pol *et al.*, 2002).

A sensibilidade do teste de captura híbrida para *C. trachomatis* varia de 95,4 a 97,2% frente à cultura e PCR (Amplacor CT PCR, Roche) e a especificidade é superior a 99,0% em amostras endocervicais (Girdner *et al.*, 1999; van Der Pol *et al.*, 2002; Darwin, 2002). Assim, o método de detecção de ácidos nucléicos baseado em amplificação de sinal apresenta sensibilidade e especificidade comparáveis aos métodos de amplificação de ácidos nucléicos em amostras endocervicais (Girdner *et al.*, 1999). Este método apresenta como vantagens dispensar a separação das áreas de trabalho e a simplificação dos equipamentos utilizados. A partir de um único *swab*, permite a pesquisa de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e papilomavírus humano (HPV).

#### **1.4 Definição de padrão-ouro**

Os métodos moleculares para o diagnóstico de *C. trachomatis* trouxeram um incremento de 20-30% de eficiência na identificação de pacientes infectados com relação às outras metodologias (Black, 1997; Warford *et al.*, 1999). Em decorrência, o teste “padrão ouro”, que anteriormente era o cultivo celular, ganhou expansão. O padrão ouro atual para diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* inclui um teste de amplificação de ácidos nucléicos (NAAT) juntamente com o cultivo celular a fim de detectar amostras que são negativas por NAAT devido à presença de inibidores (Black, 1997; Mahony *et al.*, 2003).



Os primeiros estudos realizados para avaliação de novos NAATs utilizavam testes de amplificação com alvos alternativos para *C. trachomatis* para resolver resultados discrepantes. Atualmente, com a liberação de vários NAATs pelo FDA, foi possível eliminar-se a cultura dos estudos de avaliação de novos testes. Assim, são utilizadas diferentes NAATS, e amostras de diferentes sítios, para avaliação de um novo teste, podendo-se com isso, estabelecer também a performance do teste para cada tipo de amostra. Entretanto, não está claro ainda, quantos diferentes testes devem fazer parte de um estudo para avaliar um novo teste e mais, qual a combinação de tipos de amostra que define o paciente infectado (Martin, 2004).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método de detecção por PCR para o diagnóstico de infecção por *Chlamydia trachomatis* no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul (IPB/LACEN-RS, CDCT, FEPPS).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os resultados do protocolo *in house* proposto com outros métodos moleculares.
- Determinar a especificidade dos *primers* escolhidos.
- Determinar a sensibilidade analítica do protocolo *in house*.
- Avaliar e correlacionar achados laboratoriais das amostras estudadas.

### 3. JUSTIFICATIVA

Os laboratórios de referência em saúde pública têm importante missão no que se refere ao fornecimento de dados precisos ao controle epidemiológico de doenças, na realização de análises especializadas e na constante pesquisa e desenvolvimento na área da saúde humana. Porém, não são poucos os entraves existentes no dia-a-dia das instituições. O sucateamento da rede pública de saúde força à busca por tecnologias alternativas, viáveis à realidade brasileira e que resultem em benefícios diretos à população.

A utilização de métodos moleculares, com especial referência à reação em cadeia da polimerase (PCR), em laboratórios de pesquisa é uma prática que domina o cenário científico e que já passa a ocupar espaço nos laboratórios clínicos especializados e até mesmo nos de rotina. A tecnologia disponível, no entanto, é onerosa e permanece inacessível à população em geral. Assim, a alternativa aos laboratórios de saúde pública tem sido a implantação dos métodos chamados *in house*, ou seja, métodos moleculares que são padronizados localmente e a partir de reagentes próprios. Com isso desenvolve-se uma tecnologia local, adaptada às condições e padronizada na população a que se destina. O resultado tem sido satisfatório haja vista a difusão das técnicas *in house* desenvolvidas para identificação de um grande número de patologias infecciosas e genéticas. As técnicas *in house* exigem, no entanto, alto padrão de controle de qualidade e profissionais em constante aperfeiçoamento.

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) consistem num dos maiores problemas em saúde pública atuais, não só pelo elevado e crescente número de casos, mas também por sérias complicações associadas e por aumentarem o risco para aquisição e transmissão de outras DST e do HIV. As DST estão entre as causas mais comuns de doença, atingindo, de uma forma desproporcional, a saúde e o bem-estar da mulher. O impacto maior se verifica em mulheres em idade econômica e reprodutivamente ativa, tendo conseqüências indiretas sobre a prole destas. Dados de prevalência e de

incidência das DST são limitados e subestimados. Além disso, as DST são freqüentemente assintomáticas e de diagnóstico tecnicamente difícil e oneroso.

A infecção por *C. trachomatis* está entre as principais DST consideradas curáveis pela Organização Mundial de Saúde, cuja extensão do problema já foi anteriormente relatada.

A detecção de infecção por *C. trachomatis* por métodos moleculares tem-se mostrado como uma alternativa metodológica de crescente interesse em saúde pública. Os métodos diagnósticos tradicionais apresentam limitações metodológicas particulares. A detecção de ácidos nucleicos por técnicas de amplificação é a metodologia mais sensível e específica, permitindo o emprego de amostras obtidas de forma não-invasiva. Com isso, podem ser acessadas populações assintomáticas que normalmente não buscam por serviços de DST. Os métodos comerciais de detecção de DNA de *C. trachomatis* apresentam custo final elevado, permanecendo inacessíveis à realidade em saúde de nosso país.

Este trabalho teve por objetivo propor uma metodologia molecular de detecção de ácidos nucleicos de *C. trachomatis* para diagnóstico laboratorial da infecção por este agente.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Amostras cérvico-vaginais

Foram utilizadas neste estudo noventa e duas amostras de escovados cérvico-vaginais, colhidas no período de agosto a dezembro de 2003 e que fazem parte do banco de amostras do Estudo de Prevalências e Frequências Relativas das DST no Brasil (Ministério da Saúde). Esta amostragem compreende dois grupos de pacientes sendo vinte e seis amostras de gestantes e sessenta e seis amostras de mulheres com sinais e/ou sintomas de DST (listadas na Tabela 3). Os serviços identificados para coleta dos materiais foram duas clínicas de controle pré-natal e duas clínicas de DST. As coletas foram realizadas com escova específica do Kit para HPV, *Neisseria gonorrhoeae* e *C. trachomatis* (Digene Corporation, Gaithersburg, Md.), obtendo-se material do endocérvix, ectocérvix, fundo de saco posterior, lateral e vulva. O material coletado foi enviado ao Instituto de Pesquisas Biológicas - Laboratório Central de Saúde Pública do Rio Grande do Sul (IPB/LACEN-RS) para análise. As amostras eram mantidas a -20°C em tampão de desnaturação, conforme especificado pelo fabricante.

### 4.2 Critérios de Inclusão

Os seguintes critérios de inclusão foram observados para separação da amostragem:

#### **Mulheres com sinais e/ou sintomas de DST:**

- de qualquer faixa etária;
- em primeira consulta para o problema atual;
- que não tenham recebido tratamento ou utilizado por conta própria qualquer antibiótico oral, injetável ou tratamento tópico nos últimos 15 dias;
- que não tenham mantido relações sexuais nos últimos dois dias;
- foram excluídas aquelas que conheciam sua soropositividade para o HIV ou, por esse motivo, estiverem em acompanhamento pelo serviço.

**Gestantes:**

- gestantes em primeira consulta pré-natal para a gestação atual, em qualquer período gestacional;
- de qualquer idade;
- que não tenham sido tratadas com antibióticos, ou feito uso de qualquer substância química intravaginal nos últimos 15 dias;
- que não tenham tido relação sexual nos últimos dois dias.

**4.3 Análise das Amostras pelo Método de Captura Híbrida**

As amostras foram testadas para a presença de *C. trachomatis* (CT) pelo kit Captura Híbrida II (Digene, Corp., Gaithersburg, Md.) de acordo com as especificações do fabricante. Inicialmente, a amostra colhida em kit coletor foi submetida à desnaturação com NaOH. A amostra contendo DNA desnaturado de CT hibridiza com sonda específica de RNA-CT. Os híbridos DNA-RNA são capturados sobre a superfície de uma microplaca sensibilizada com anticorpo anti-híbrido DNA-RNA. Os híbridos imobilizados reagem com fosfatase alcalina conjugada a anticorpos específicos para híbrido DNA-RNA e o complexo formado é detectado por reação com substrato quimioluminescente. Várias moléculas de fosfatase são conjugadas para cada molécula de anticorpo. Múltiplos anticorpos conjugados se ligam a cada híbrido capturado resultando na amplificação de sinal. A luz é emitida e medida em luminômetro em Unidade de Luz Relativa (RLU) (Manual de Instruções, Digene).

**4.4 Seleção da seqüência alvo para amplificação do DNA de *Chlamydia trachomatis***

A seqüência de 201pb do plasmídio críptico de *C. trachomatis* flanqueada pelos *primers* CTP1 e CTP2 (item 4.4.2, seção Materiais e Métodos) descrita por Griffais & Thibon (1989) foi a escolhida.

O plasmídio críptico de *C. trachomatis* consiste num alvo interessante para testes diagnósticos, pois possui um número de cópias que varia de 7 a 10 por

célula bacteriana, apresentando menos de 1% de variação na seqüência nucleotídica na espécie *C. trachomatis* e está presente em 99% das cepas desta espécie (Black, 1997; Mahony *et al.*, 2003; <http://www.chlamydia - www.berkeley.edu:4231/index.html>)

#### **4.5 Protocolo *in house* para Detecção de *Chlamydia trachomatis***

O material de coleta com escova específica para captura híbrida já desnaturado com NaOH foi submetido ao protocolo *in house* para detecção de *C. trachomatis*.

##### **4.5.1 Extração de DNA**

As amostras foram submetidas à extração do DNA genômico com a utilização do kit comercial Ultra Clean (Mobio Laboratories Inc.) de acordo com as especificações do fabricante. Este consiste num kit de isolamento de DNA genômico de amostras de tecido a partir de purificação em coluna de resina de sílica.

O volume de amostra utilizado foi de 500 $\mu$ L do material desnaturado da técnica de captura híbrida. O volume final de eluição foi de 50 $\mu$ L.

##### **4.5.2 Reação de Amplificação**

O DNA purificado das amostras foi submetido à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se os *primers* CTP1 e CTP2 que flanqueiam um segmento de 201 pb da ORF de número 4 do plasmídio críptico de *C. trachomatis* (Griffais & Thibon, 1989). Este segmento localiza-se a 2940 pb do sítio único de restrição de BamHI.

Abaixo a seqüência dos *primers* utilizados:

CTP1: 5' - TAG TAA CTG CCA CTT CAT CA - 3'

CTP2: 5´ - TTC CCC TTG TAA TTC GTT GC - 3´

A mistura de reação para um volume de 50 µL, continha 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco, BRL, Life Technologies), *primers* na concentração de 12,50 pmol cada; 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada desoxinucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen), 10mM de Tris-HCl (pH 8,3) e 50mM de KCl (Lan *et al.*,1993).

A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC 96 nas seguintes condições: 95°C por 4 min, para desnaturação, 40 ciclos subsequentes consistindo cada ciclo de: uma etapa de desnaturação a 95°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 66°C por 1 minuto e uma etapa de 72°C por 1 minuto para extensão. Ao final, uma etapa a 72°C por 4 minutos, para extensão final.

Para controlar o funcionamento da reação, foram ensaiados, juntamente com cada bateria de DNA de amostras clínicas, um controle positivo de reação (CPR) que consistia do fragmento de 201 pb clonado em plasmídeo pUC18, e um controle negativo de reação (CNR) com omissão de qualquer DNA.

#### 4.5.3 Análise dos Produtos Amplificados

Os produtos amplificados foram detectados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TBE 1x, contendo 0,05% de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV). O volume de produto amplificado aplicado no gel correspondeu a 15µl. As condições da corrida eletroforética foram de 100V, com corrente de 50mA e tempo de 40 minutos. O tamanho dos fragmentos gerados por amplificação foi controlado pelo uso de marcador de tamanho molecular em escala de 100 pb e do CPR que correspondia a 201 pb.

O resultado foi considerado positivo para presença de DNA de *C. trachomatis* quando visualizada a banda correspondente ao fragmento de 201pb.



#### 4.6 Hibridização dos Produtos de PCR

Após a corrida eletroforética, os produtos de PCR foram transferidos do gel de agarose para membrana de náilon (Hybond-N Amersham) pelo processo de capilaridade conforme descrito por *Southern* (1975). Após a transferência, os fragmentos de DNA foram fixados à membrana em forno a 80°C por 120 minutos.

Como sonda utilizou-se o fragmento de 201 pb originado por reação de PCR com *primers* CTP1 e CTP2 na concentração de 100ng/μL. Este fragmento foi purificado utilizando-se o kit Microspin S-300 HR Columns (Amersham Pharmacia Biotech). A marcação do fragmento para hibridização foi realizada com o kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems. O fragmento utilizado como sonda foi previamente seqüenciado, conforme descrito no item 4.10.

A reação de hibridização com a sonda marcada foi realizada a 42°C por 14 horas em forno giratório (*Hybaid Instruments*, Holbrook, NY). A detecção do sinal quimioluminescente foi realizada pela sensibilização de um filme autorradiográfico.

#### **4.7 Determinação da Especificidade dos *Primers***

A especificidade dos *primers* CTP1 e CTP2 foi testada submetendo-se a reação de amplificação o DNA de diferentes microrganismos da microbiota normal do trato genito-urinário feminino, agentes patogênicos e DNA humano. Os DNAs de isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e *Lactobacillus sp.* foi extraído e purificado pelo método de CTAB (Cloreto de cetil-trimetil-amônio) descrito por van Soolingen e colaboradores (1994). Os DNAs de papiloma vírus humano subtipos 16 e 33 foi obtido por lise com proteinase K (Coutlée *et al.*, 2002). O DNA humano foi extraído com DNAzol (Gibco-BRL, Life Technologies).

Os DNAs extraídos e purificados foram quantificados por espectrofotometria no equipamento Genequant (Pharmacia Biotech), e diluídos à ordem de 100ng/ $\mu$ L para uso na PCR.

#### **4.8 Determinação do Limite de Detecção Analítica da PCR *in house***

##### **4.8.1 Extração de DNA de *Chlamydia trachomatis***

Para obter-se DNA genômico de *C. trachomatis* realizou-se a extração a partir de lâminas sensibilizadas com células clamidiais (*C. trach.* IgG IFA, Hemagen Diagnostics, Inc.). As lâminas foram raspadas com lâmina de bisturi e o material eluído e concentrado em tubo de microcentrífuga. A seguir, procedeu-se à extração com o kit comercial *Ultra Clean* (Mobio Laboratories Inc.). O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria a 260nm no equipamento Genequant (Amersham Pharmacia Biotech).

##### **4.8.2 Teste de Sensibilidade Analítica**

Para determinação da sensibilidade analítica da técnica, submeteram-se diluições seriadas de DNA de *C. trachomatis* em água ultrapura ao protocolo de

PCR *in house* com detecção em gel de agarose e à hibridização. As concentrações de DNA variaram de 30ng/ $\mu$ L a 60 fg/ $\mu$ L.

#### 4.9 Clivagem Enzimática do Produto Amplificado

A fim de confirmar a amplificação específica da seqüência de 201 pb de *C. trachomatis*, os produtos de amplificação foram clivados com a enzima EcoRV . Esta apresenta um único sítio de restrição na seqüência de 201 pb de CT. Na reação utilizaram-se tampão 10x (TRIS HCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 50mM), EcoRV (10U/ $\mu$ L) e 100ng/ $\mu$ L de produto amplificado. As reações foram realizadas *overnight* a 37°C e os produtos das clivagens foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3,0%, em tampão TBE 1x, contendo 0,05% de brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta (UV).

#### 4.10 Seqüenciamento do Produto Amplificado

O fragmento de 201 pb, obtido após reação de amplificação com DNA de *C. trachomatis* proveniente de isolado clínico, foi purificado em coluna Microspin S-300 (Amersham Pharmacia Biotech). O produto purificado foi então preparado para seqüenciamento através de reação de PCR (25 ciclos consistindo cada ciclo de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C) com Kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing v 1.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems, USA). Foram utilizados os *primers* CTP1 e CTP2 na concentração de 3nmol/ $\mu$ L e 100ng de produto amplificado e *Cycle Sequencing mix* em proporções conforme a indicação do fabricante. O produto desta PCR foi purificado com isopropanol 75% e com etanol 70%. O sedimento obtido após a purificação foi dissolvido em formamida, e desnaturado por 5 minutos a 95°C, de acordo com especificações do fabricante. A corrida eletroforética foi realizada no seqüenciador automático, modelo ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, USA). A análise das seqüências *forward* e *reverse* foi feita por comparação com seqüências depositadas no Genbank, utilizando-se o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)).

#### 4.11 Análise de amostras pelo Sistema COBAS Amplicor

Amostras cujo resultado da PCR *in house* foi discordante da análise por captura híbrida foram submetidas ao teste com kit comercial para detecção de CT por PCR, o kit COBAS Amplicor (Roche Diagnostics, Branchburg). Numa adaptação do protocolo, utilizaram-se 500 $\mu$ L do material disponível previamente desnaturado em meio de transporte da Digene e volume proporcional de 500 $\mu$ L do tampão de lavagem do kit COBAS Amplicor. A seguir, a amostra foi tratada de acordo com as especificações do kit COBAS Amplicor para preparação da amostra. A mistura de PCR é composta por deoxinucleosídeos trifosfatados, polimerase, *primers* biotinilados, uracil-N-glicosilase e controle interno. O controle interno deste kit consiste num DNA de seqüência aleatória com extremidades de ligação complementares aos *primers* de *C. trachomatis*. A reação de amplificação consta de um passo inicial de 5 minutos a 95°C e 1 minuto a 60°C, seguido de 29 ciclos de 30 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A reação é mantida a 72°C até a adição da solução desnaturante (NaOH). Os produtos de PCR biotinilados e desnaturados são automaticamente hibridizados com sondas específicas para *C. trachomatis* e para o controle interno. A seguir, os híbridos são postos em reação com estreptavidina conjugada a peroxidase e que possui alta afinidade pela biotina. A peroxidase ligada ao complexo reage com peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, gerando um produto colorido que é detectado por espectrofotometria a 450nm (Leoffelholz *et al.*, 1992; Livengood & Wrenn, 2001).

#### 4.12 Clonagem do fragmento de 201pb de *Chlamydia trachomatis*

O fragmento de 201 pb originado pelos *primers* CTP1 e CTP2 foi tratado com DNA Polimerase fragmento de Klenow a fim de gerarem-se extremidades cegas. A seguir, o produto amplificado foi purificado com kit GFX (DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences) e o fragmento foi clonado em pUC 18, utilizando-se ligase MBI (Fermentans). *Escherichia coli* XL-1 *blue* foi transformada por eletroporação (Gene Pulser II Systems, Bio-Rad Laboratories), o plaqueamento foi feito em meio LB, acrescido de ampicilina (100  $\mu$ g/mL), XGal

(40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e IPTG (0,1 mM), e as placas foram incubadas *overnight* a 37°C. A extração do DNA plasmidial foi realizada por lise alcalina (Sambrook & Russel, 2001) e 1  $\mu\text{L}$  do extrato foi submetido a PCR com *primers* CTP1 e CTP2.

#### 4.13 Teste de inibição da PCR

Para verificar a possibilidade de interferentes da PCR presentes optou-se por realizar um teste de inibição da reação. O DNA de *C. trachomatis* na concentração limite de detecção em gel de agarose (600 fg/ $\mu\text{L}$ ) foi adicionado à mistura de reação juntamente com o DNA das amostras clínicas supostamente inibidas.

#### 4.14 Análise Estatística

Os resultados obtidos com as metodologias de captura híbrida, PCR e hibridização foram tabulados e analisados pelo software SPSS for Windows versão 10.0. O teste de McNemar foi usado para classificar como concordantes ou não, analisando-se os métodos dois a dois. O valor de kappa foi calculado para determinar a concordância entre pares de métodos. Os valores de kappa podem indicar fraca ou leve concordância (0,0 a 0,3), concordância moderada (de 0,31 a 0,6), alta concordância (de 0,61 a 0,9), e altíssima concordância (acima de 0,91) ([www.cmh.edu/stats/definitions/kappa.htm](http://www.cmh.edu/stats/definitions/kappa.htm)).

A correlação entre a positividade dos resultados nas metodologias empregadas e de outras análises laboratoriais foi investigada com uso do teste Exato de Fisher. A frequência relativa dos dados pessoais das pacientes foi calculada com auxílio do software Epi Info v.6.0.

## 5. RESULTADOS

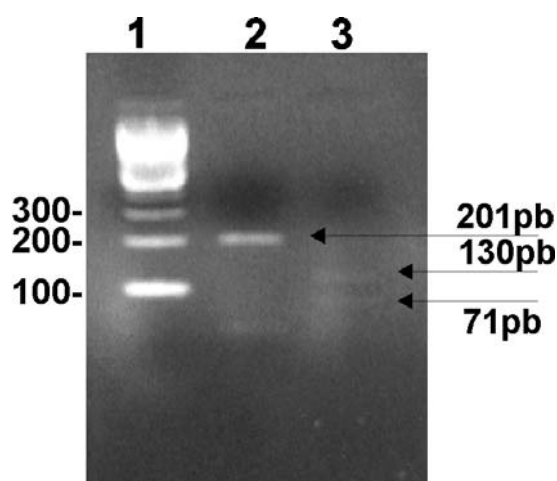
Com o objetivo de desenvolver um protocolo de diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* baseado na técnica de PCR, foram realizados experimentos de padronização e comparação da performance do mesmo frente a outros testes moleculares.

### 5.1 Amplificação de DNA a partir de EBs de *Chlamydia trachomatis*

O DNA de *C. trachomatis* na concentração de 100ng/ $\mu$ L foi utilizado na reação de amplificação nas condições do protocolo proposto por Lan e colaboradores (1993). O fragmento de 201pb foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de ultra-violeta (UV).

### 5.2 Confirmação da Seqüência Amplificada

Para verificar se a seqüência do fragmento de DNA amplificado com os *primers* CTP1/CT2 era a esperada, foi realizada a clivagem enzimática com EcoRV e o seqüenciamento do produto de PCR purificado. A clivagem enzimática originou dois fragmentos, um de 130pb e outro de 71 pb, conforme esperado, os quais foram detectados em gel de agarose a 3% (Figura 4).



**Figura 4. Análise eletroforética do produto de PCR após clivagem com *EcoRV*.** 1. marcador de tamanho molecular 100bp; 2. produto de PCR não clivado; 3. produto de PCR clivado.

A análise da seqüência de 201pb por seqüenciamento automático e posterior alinhamento no software BLAST revelou 100% de complementariedade com a seqüência do plasmídio críptico de *C. trachomatis* depositada no GenBank sob número de acesso AE001273 (Figura 5).

```

201pb  57  caatctattaagatatctcccaaattggctcaaaatgggatggtagaagttataggtctt 116
      |||
pLGV440 3006 caatctattaagatatctcccaaattggctcaaaatgggatggtagaagttataggtctt 3065

201pb  117  gattttccttcatctcattacatgcattagcagctatccaaagattactgaccgcaacg 176
      |||
pLGV440 3066 gattttccttcatctcattacatgcattagcagctatccaaagattactgaccgcaacg 3125

201pb  177  aattacaaggggaa 190
      |||
pLGV440 3126 aattacaaggggaa 3139

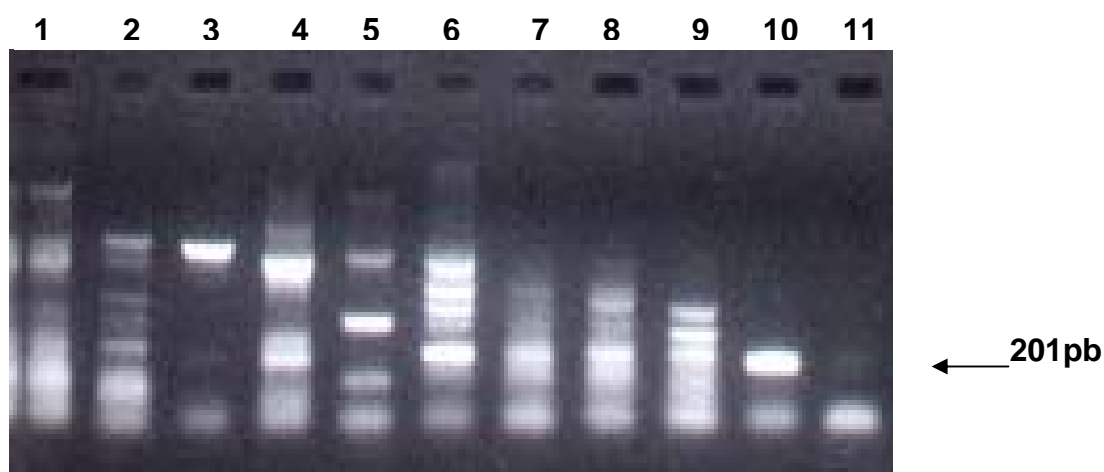
```

**Figura 5. Alinhamento da seqüência de 201 pb com a seqüência depositada do plasmídio LGV440 de *Chlamydia trachomatis*.**

### 5.3 Determinação da Especificidade dos *primers*

A especificidade dos *primers* CTP1 e CTP2 foi testada submetendo-se o DNA de diferentes microrganismos da microbiota normal do trato urogenital feminino, outros agentes patogênicos e DNA humano à amplificação.

Nas condições de reação propostas por Lan e colaboradores (1993) verificou-se um grande número de amplificações inespecíficas (Figura 6).



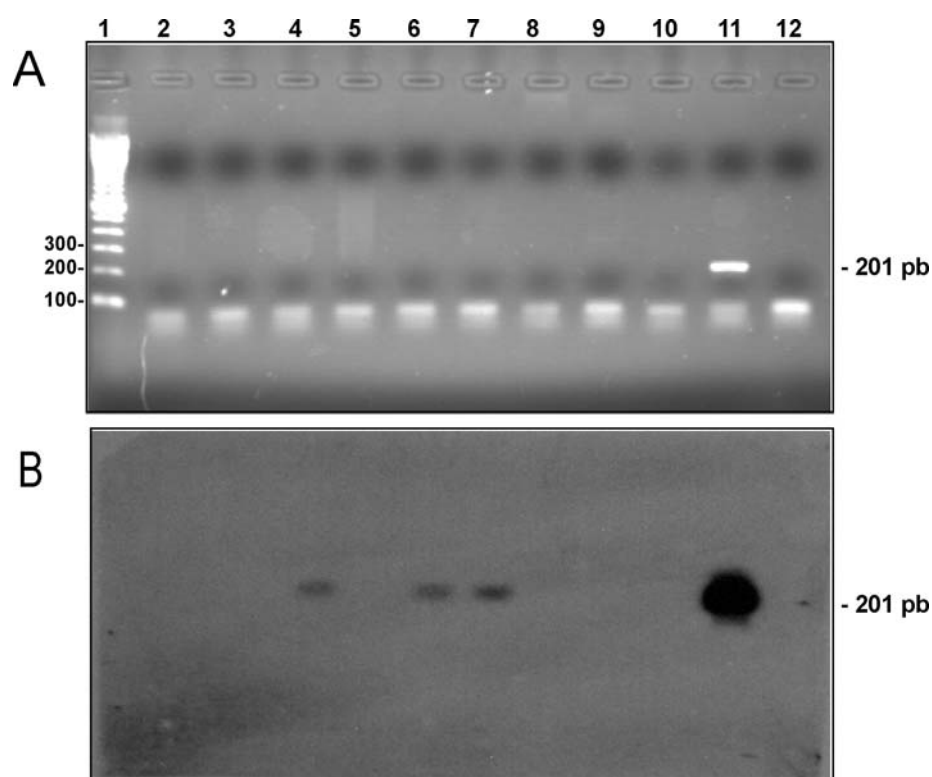
**Figura 6. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% do teste de especificidade dos *primers* utilizados.** 1) *E. coli*; 2) *C. albicans*; 3) *S. aureus*; 4) *N. gonorrhoeae*; 5) *Lactobacillus spp*; 6) DNA humano; 7) HPV16; 8) HPV31; 9) *T. vaginalis*; 10) *C. trachomatis* (100ng/ $\mu$ L); 11) controle negativo da reação.

### 5.4 Adequação da Temperatura de Anelamento

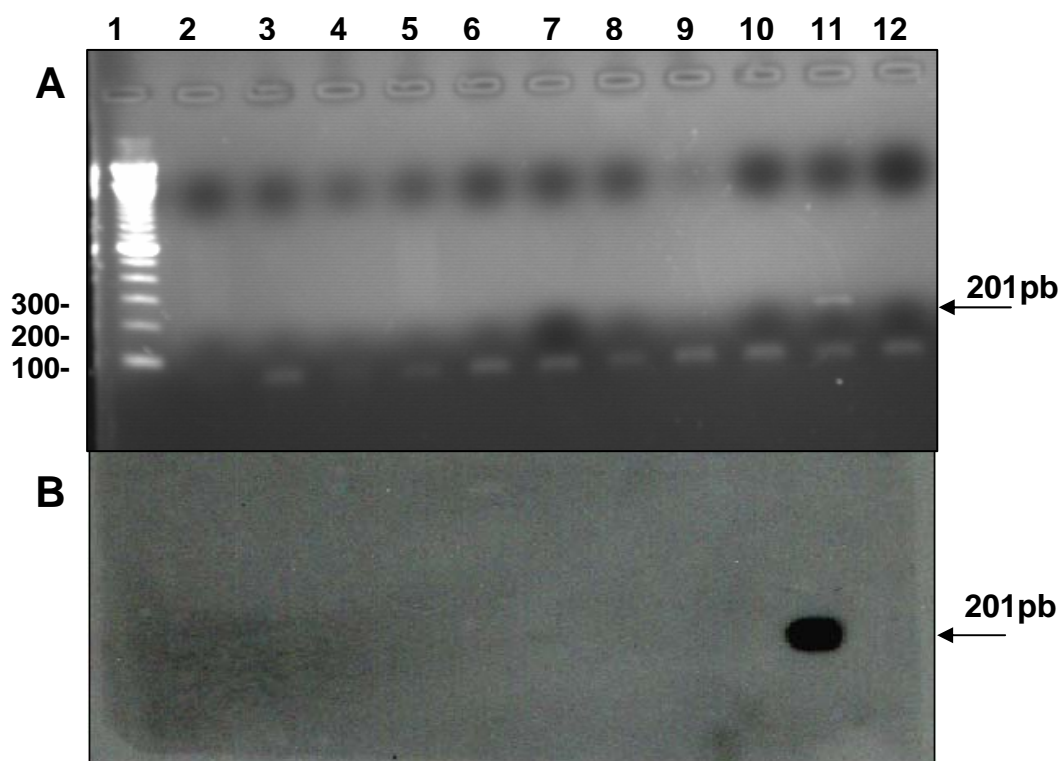
A fim de eliminarem-se as amplificações inespecíficas verificadas no teste de especificidade, optou-se por aumentar a estrigência da reação através da elevação da temperatura de anelamento dos *primers*. Assim, foram feitos testes com as seguintes temperaturas 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C e 66°C. As amplificações inespecíficas foram observadas pela detecção em gel de agarose até a temperatura de 60°C. A partir de 62°C não foram mais observadas amplificações inespecíficas em gel de agarose. Os produtos de amplificação



obtidos com temperaturas de anelamento de 62°C, 64°C e 66°C foram submetidos à hibridização com sonda homóloga para a seqüência de 201pb do plasmídio de *C. trachomatis*. Foram observadas ampliações inespecíficas para os DNAs de *S. aureus*, *Lactobacillus sp* e DNA humano após hibridização até a reação com temperatura de anelamento de 64°C (Figura 7). O teste com temperatura de anelamento de 66°C foi específico para o fragmento de 201pb do plasmídio críptico de *C. trachomatis*, não apresentando nenhuma amplificação inespecífica após hibridização (Figura 8).



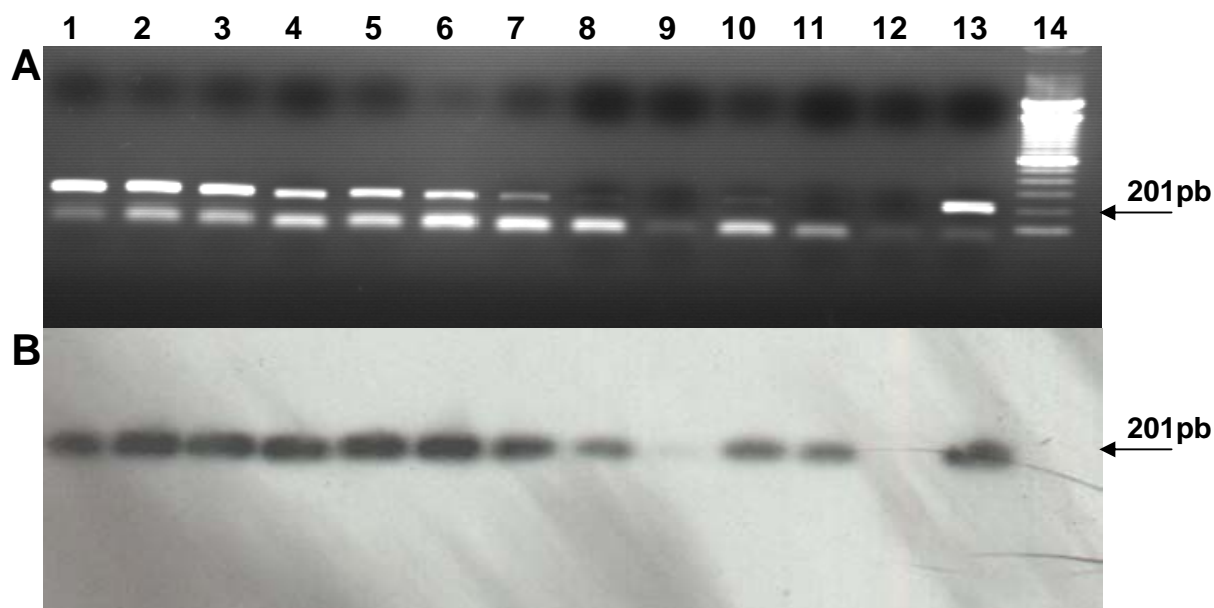
**Figura 7. Teste de especificidade dos primers com temperatura de anelamento de 64°C.** A - Análise eletroforética em gel de agarose 1,5%. B - Autoradiografia da hibridização. Canaleta 1. marcador de tamanho molecular 100pb; 2. *E. coli*, 3. *C. albicans*; 4. *S. aureus*; 5. *N. gonorrhoeae*; 6. *Lactobacillus spp*; 7. DNA humano; 8. HPV16; 9. HPV31; 10. *T. vaginalis*; 11. *C. trachomatis*; 12. Controle negativo da reação.



**Figura 8. Teste de especificidade dos *primers* com temperatura de anelamento de 66°C.** A - Análise eletroforética em gel de agarose 1,5%. B - Autoradiografia da reação de hibridização. Canaleta 1. marcador de tamanho molecular 100pb; 2. *E. coli*; 3. *C. albicans*; 4. *S. aureus*; 5. *N. gonorrhoeae*; 6. *Lactobacillus sp*; 7. DNA humano; 8. HPV16; 9. HPV31; 10. *T. vaginalis*; 11. *C. trachomatis*; 12. Controle negativo da reação.

### 5.5 Determinação do Limite de Detecção

Para determinar o limite de detecção do teste proposto, foi utilizado DNA de *C. trachomatis* extraído conforme descrito na seção 4.7.1 dos Materiais e Métodos. Partindo-se da concentração de 30ng/ $\mu$ L, foram realizadas diluições do DNA até 60fg/ $\mu$ L. Para a reação de PCR foi utilizado 1 $\mu$ L de cada diluição. O limite de detecção verificado em gel de agarose foi de 600 fg/ $\mu$ L. Após hibridização, obteve-se o limite de detecção de 300fg/ $\mu$ L (Figura 9).



**Figura 9. Teste de sensibilidade analítica da PCR.** A) Análise eletroforética em gel de agarose 1,5%. B) Autoradiografia da reação de hibridização. Canaleta 1) 30ng/ $\mu$ L; 2) 6ng/ $\mu$ L; 3) 3ng/ $\mu$ L; 4) 600 pg/ $\mu$ L; 5) 300pg/ $\mu$ L; 6) 60pg/ $\mu$ L; 7) 30pg/ $\mu$ L; 8) 6pg / $\mu$ L; 9) 3pg/ $\mu$ L; 10) 600 fg/ $\mu$ L; 11) 300fg/ $\mu$ L; 12) 60fg/ $\mu$ L; 13) controle positivo de reação; 14) marcador de tamanho molecular 100pb.

### 5.6 Análise das Amostras Clínicas

Foram testadas 92 amostras de raspado cérvico-vaginal pelos métodos de captura híbrida, PCR e hibridização. Consideraram-se positivas por PCR as amostras que após amplificação produziram um fragmento de 201pb (Figura 10).

Das 92 amostras analisadas, 50 apresentaram resultado positivo e 42 apresentaram resultado negativo para o teste de captura híbrida. Os resultados obtidos com o protocolo de PCR *in house* foram avaliados através da detecção em gel e após hibridização, separadamente. Das 50 amostras consideradas positivas pela captura híbrida, 38 foram confirmadas pela PCR e por hibridização. De 12 amostras inicialmente negativas por PCR, 7 confirmaram ser positivas pela hibridização e 5 mantiveram-se negativas. De 42 amostras negativas por captura híbrida, 29 foram confirmadas com resultado negativo por PCR. Destas 29, 20 confirmaram ser negativas por hibridização e 9 foram

positivas na hibridização. As outras 13 amostras negativas pela captura híbrida apresentaram resultado positivo por PCR e por hibridização (Tabela 2).



**Figura 10. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR obtidos com os *primers* CTP1/CTP2 a partir de amostras cérvico-vaginais. Canaletas 1. marcador de tamanho molecular 100pb. 2-6. Amostras positivas pela captura híbrida. Canaletas 7-12. Amostras negativas pela captura híbrida. 13. Controle negativo da reação. 14. Controle positivo da reação.**

O teste de McNemar e de kappa foram aplicados na comparação dos resultados obtidos com as metodologias. O teste de McNemar constatou haver concordância entre as três metodologias ( $P < 0,001$ ). Verificou-se concordância moderada nos comparativos entre captura híbrida e PCR (valor de Kappa: 0,45), captura híbrida e hibridização (valor de kappa: 0,389) e, PCR e hibridização (valor de Kappa: 0,634).

Os resultados de cada uma das metodologias utilizadas nas 92 amostras estão listados na Tabela 3.

**Tabela 2.** Comparação entre os resultados obtidos nas metodologias utilizadas para detecção de *Chlamydia trachomatis* nas amostras clínicas.

Total de amostras		PCR (detecção em gel)		Hibridização	
		POS	NEG	POS	NEG
Captura Híbrida	POS (50)	38		38	
			12	7	5
Captura Híbrida	NEG (42)		29	9	20
		13		13	

Doze amostras cujo resultado por captura híbrida foi positivo e por PCR foi negativo foram submetidas a um outro teste molecular, a PCR COBAS Amplicor. Em 10 amostras ocorreu inibição da reação, o que foi demonstrado pela falta de amplificação do controle interno de reação. Uma amostra foi positiva e uma foi negativa pela PCR COBAS Amplicor. As 13 amostras que foram negativas por captura híbrida, e positivas por PCR foram testadas da mesma forma pela PCR COBAS Amplicor. Todos os resultados foram negativos, considerados válidos pela positividade do controle interno de reação (Tabela 4).

**Tabela 3.** Resultados das análises individuais das amostras cérvico-vaginais utilizadas nesse estudo.

Nºamostra	CH	RLU/CO	PCR	Hibr.	Bacterioscopia	PCR COBAS*	Presença de outros agentes etiológicos
CDST024	pos	11,22	pos	pos	BGP +30 e DGN menos de 1/C		HPV alto risco
CDST052	pos	21,74	pos	pos	BGP +30/C		HPV alto risco, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST069	pos	187,99	pos	pos	BGP +30 e CGP 1-4 /C		HPV alto risco
CDST098	pos	1320,47	pos	pos	BGP +30/C		
CDST117	pos	1,18	neg	pos	BGP +30/C e CGP 5-30/C	NEG/NEG	HPV alto e baixo risco
CDST121	pos	1717,62	pos	pos	BGN +30/C, <i>Mobiluncus sp.</i>		HPV alto risco, <i>Mobiluncus sp.</i> , <i>Gardnerellasp.</i>
CDST125	pos	45,86	pos	pos	BGN +30/C, BGP +30/C, NL		<i>Gardnerella sp.</i>
CDST131	pos	1,12	neg	pos	BGP +30/C, NL	NEG/NEG	
CDST133	pos	110,52	neg	neg	BGP +30/C, NL	NEG/NEG	
CDST137	pos	2,53	neg	pos	BGP +30/C	NEG/NEG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST142	pos	43,49	pos	pos	BGN +30/C, <i>Mobiluncus sp.</i> +30/C, NL		<i>Mobiluncus sp.</i> , <i>Gardnerella sp.</i>
CDST144	pos	229,04	pos	pos	BGN +30/C, BGP +30/C, NL		HPV alto risco, <i>Gardnerellasp.</i>
CDST157	pos	1600,66	pos	pos	BGN +30/C, <i>Mobiluncus sp.</i> +30/C, NL		<i>Mobiluncus sp.</i> , <i>Gardnerellasp.</i>
CDST159	pos	633,86	pos	pos	BGP +30/C		
CDST164	pos	29,26	pos	pos	BGP +30/C		<i>Gardnerella sp.</i>
CDST174	pos	1,44	pos	pos	NL		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST182	pos	769,57	pos	pos	CGP 5-30/C, NL		HPV alto e baixo risco
CDST183	pos	4,11	neg	pos	BGP +30/C	NEG/NEG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , HPV alto risco
CDST190	pos	66,08	pos	pos	NL		
CDST193	pos	199,34	pos	pos	CGP 1-4/C e BGP 5-30/C		
CDST308	pos	24,91	pos	pos	BGP +30/C		
CDST314	pos	30	pos	pos	DGN 5-30 /C, VL		
CDST327	pos	2,49	neg	neg	BGP +30/C	POS/POS	
CDST336	pos	643,1	pos	pos	NL		HPV alto e baixo risco, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST387	pos	222,32	pos	pos	BGP +30/C, VL		HPV alto e baixo risco
CDST397	pos	89,12	pos	pos	BGP +30/C		
CDST402	pos	2,31	pos	pos	BGP +30/C, RL		HPV baixo risco, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST414	pos	3,1	neg	pos	BGP +30/C	NEG/NEG	HPV alto risco, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST420	pos	473,1	pos	pos	BGP +30/C, NL		HPV alto e baixo risco
CDST421	pos	466,76	pos	pos	BGP 5-30/C, BGN 5-30/C, NL		
CDST427	pos	1305,58	pos	pos	BGP +30/C		HPV alto risco, <i>Gardnerella.sp</i>
CDST443	pos	1,53	pos	pos	BGP +30/C		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST472	pos	4,12	neg	pos	BGP +30/C, AL	NEG/NEG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , HPV alto risco

Nºamostra	CH	RLU/CO	PCR	Hibr.	Bacterioscopia	PCR COBAS*	Presença de outros agentes etiológicos
CDST475	pos	2509,3	pos	pos	BGP +30/C,NL		HPV alto e baixo risco, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST486	pos	4,94	neg	neg	BGP +30 e CGP 1-4/C	NEG/NEG	HPV alto risco, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST497	pos	2,51	neg	neg	BGP +30/C	NEG/NEG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST499	pos	2	pos	pos	BGP +30/C,NL		HPV alto risco, <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST505	pos	3,66	neg	pos	BGP 5-30/C,BGN +30/C,VL, <i>Mobiluncus sp.</i>	NEG/POS	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>Mobiluncus sp.</i> , <i>Gardnerellasp.</i>
CDST525	pos	1,58	pos	pos	BGP +30/C,NL		HPV alto e baixo risco
CPN319	pos	1	pos	pos	BGP +30/C		
CPN323	pos	1,91	neg	neg	ML	NEG/NEG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CPN361	pos	2,98	pos	pos	BGP +30/C		HPV alto e baixo risco
CPN393	pos	2034,1	pos	pos	NL		
CPN427	pos	2568,29	pos	pos	BGP +30/C,AL		
CPN457	pos	69,46	pos	pos	AL		
CPN476	pos	1721,84	pos	pos	BGP +30/C		
CPN481	pos	2405,32	pos	pos	ML		
CPN501	pos	5,56	pos	pos	VL		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CPN512	pos	13,38	pos	pos	BGN +30/C,BGP +30/C,NL		
CPN515	pos	4,77	pos	pos	AL		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
CDST056	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30 /C		HPV alto e baixo risco
CDST077	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30 /C		HPV alto e baixo risco
CDST078	neg	inferior a 1,0	neg	pos	BGP + 30 /C, NL, RDGN		HPV alto risco
CDST130	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30 /C, NL		HPV alto risco
CDST145	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30/C, BGN +30 /C		
CDST150	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30/C, BGN +30 /C		HPV alto risco
CDST151	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30/C, BGN +30 /C		
CDST153	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30/C, BGN +30/C		
CDST191	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGN +30 /C		HPV baixo risco
CDST192	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30/C, BGN 5 A 30 /C, NL		
CDST194	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP+30/C, ML	NEG/POS	
CDST196	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP +30/C		
CDST197	neg	inferior a 1,0	neg	pos	ML		
CDST199	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP +30/C	NEG/POS	
CDST200	neg	inferior a 1,0	pos	pos	CGP 5-30/C, BGN 5-30/C,NL	NEG/POS	
CDST201	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP +30/C		
CDST202	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP + 30/C, BGN +30 /C	NEG/POS	HPV alto risco
CDST203	neg	inferior a 1,0	neg	neg	CGP 5-30/C		HPV alto e baixo risco
CDST204	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP + 30/C, NL	NEG/POS	HPV alto risco
CDST205	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP + 30/C, NL	NEG/POS	HPV alto risco
CDST208	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP +30 /C	NEG/POS	
CDST209	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP+30/C, ML		
CDST210	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP+30/C, ML		
CDST309	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP+30/C		HPV alto risco
CDST319	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP+30/C		HPV baixo risco

Nºamostra	CH	RLU/CO	PCR	Hibr.	Bacterioscopia	PCR COBAS*	Presença de outros agentes etiológicos
CDST323	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP+30P/C, ML		HPV alto e baixo risco
CDST365	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP +30/C, BGN +30/C		
CPN308	neg	inferior a 1,0	neg	neg	BGP +30/C, BGN +30/C		HPV alto e baixo risco
CPN350	neg	inferior a 1,0	neg	pos	BGP +30/C		HPV alto risco
CPN432	neg	inferior a 1,0	neg	pos	BGP 5-30/C,BGN +30/C		
CPN462	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP +30/C	NEG/POS	HPV baixo risco
CPN466	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP +30/C	NEG/POS	
CPN469	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP +30/C	NEG/POS	HPV alto e baixo risco
CPN473	neg	inferior a 1,0	neg	pos	BGP +30/C,NL		
CPN483	neg	inferior a 1,0	neg	pos	BGP +30/C,VL, <i>Candida sp.</i>		HPV alto e baixo risco, <i>Candida sp</i>
CPN492	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP +30/C	NEG/POS	
CPN496	neg	inferior a 1,0	neg	pos	BGP +30/C,NL		HPV alto e baixo risco
CPN506	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP +30/C,NL	NEG/POS	HPV alto e baixo risco
CPN524	neg	inferior a 1,0	pos	pos	BGP +30/C,NL	NEG/POS	HPV alto risco
CPN518	neg	inferior a 1,0	neg	pos	BGP +30/C		
CPN526	neg	inferior a 1,0	neg	pos	BGN +30/C, ML, <i>Candida sp.</i>		<i>Candida sp.</i>

CDST: clínica de doenças sexualmente transmissíveis. CPN: clínica de pré-natal. BGN: bacilo Gram negativo. DGN: diplococo Gram negativo. BGP: bacilo Gram positivo. RL: raros leucócitos, 0-10/campo. AL: alguns leucócitos, 10-20/campo. VL: vários leucócitos 20-30/campo. ML: muitos leucócitos, 30-40/campo. NL: numerosos leucócitos, mais de 50/campo. CH: captura híbrida. RLU/CO: unidade relativa de luminescência do teste de captura híbrida.

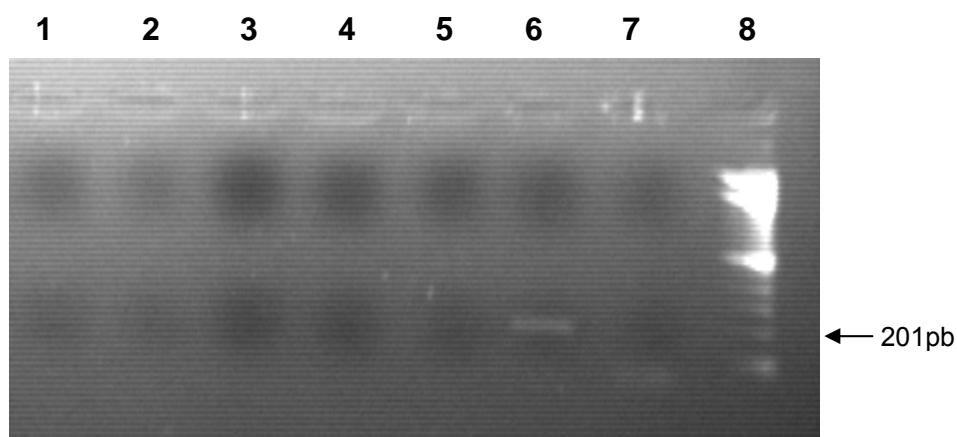
\* CT/CI: *Chlamydia trachomatis*/controle interno.



**Tabela 4.** Comparação entre os resultados obtidos na análise por PCR COBAS Amplicor.

		PCR COBAS Amplicor		
		POS	NEG	INIBIÇÃO
CH POS	PCR NEG	1	1	10
CH NEG	PCR POS		13	

As 5 amostras que não apresentaram positividade após hibridização foram submetidas a um teste de inibição da PCR (Seção nº 4.12 de Materiais e Métodos) (Figura 11. O percentual de inibição da PCR foi de 7,5% dentre as amostras positivas pela hibridização e de 10,0% dentre as amostras positivas por captura híbrida.



**Figura 11.** Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% dos produtos de PCR obtidos após reação com *primers* CTP1/CTP2 em teste de inibição da reação. Canaletas 1-5: amostras clínicas; 6. Controle Positivo da Reação (600fg/μL); 7. Controle Negativo da Reação; 8. marcador de tamanho molecular 100pb.

### 5.7 Resultados de Outras Análises Laboratoriais

Foram preparados esfregaços de secreção vaginal das 92 pacientes cujas amostras cérvico-vaginais foram analisadas pelas técnicas moleculares. Os esfregaços foram corados pelo método de Gram e analisados por microscopia.

A presença ou não de mais de 10 leucócitos polimorfonucleares por campo analisado foi o parâmetro utilizado na comparação com os resultados dos testes de captura híbrida, PCR e hibridização.

**Tabela 5.** Comparativo entre os resultados obtidos nas metodologias utilizadas com a análise bacterioscópica.

	Mais de 10 PMNs/campo	Menos de 10 PMNs/campo	Valor de P
Captura híbrida positiva (50)*	32	22	0,295
Captura híbrida negativa (42)	9	33	
PCR positiva (52)	30	22	0,208
PCR negativa (44)	18	24	
Hibridização positiva (67)	38	29	0,06
Hibridização negativa (25)	8	17	

\*Entre parênteses, número de amostras positivas e negativas para cada uma das metodologias empregadas.

Para analisar a correlação entre os resultados obtidos com as três metodologias diagnósticas utilizadas, o teste exato de Fisher foi aplicado. O valor de P (0,06) indica que possa haver associação entre a presença de mais de 10 leucócitos polimorfonucleares em esfregaço vaginal e a positividade da técnica de hibridização para a detecção de *C. trachomatis*. As demais associações não foram significativas (Tabela 5).

As amostras cérvico-vaginais coletadas com *swab* e meio de transporte específico (Digene) foram submetidas aos testes de captura híbrida para detecção de *Neisseria gonorrhoeae* e de HPV de alto e baixo risco. A análise

bacterioscópica constatou, por sua vez, a presença de *Gardnerella sp.*, *Mobiluncus sp* e *Candida sp.* Das 92 amostras analisadas, 54 (58,69%) apresentavam ao menos um outro agente etiológico de DST. A Tabela 6 apresenta os achados laboratoriais de outros agentes etiológicos nas amostras analisadas.

O Teste Exato de Fisher foi aplicado, verificando-se ausência de associação entre a positividade das metodologias empregadas e a presença de infecção mista.

**Tabela 6.** Presença de outros agentes etiológicos nas amostras cérvico-vaginais analisadas.

<b>Agente etiológico</b>	<b>Nº de achados</b>
HPV alto e/ou baixo risco	40
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	17
<i>Gardnerella sp.</i>	8
<i>Mobiluncus sp.</i>	4
<i>Candida sp.</i>	2

## 5.8 Análise dos Dados Pessoais

Com base no questionário aplicado no projeto original intitulado “Estudo das Prevalências e Frequências Relativas das DST no Brasil”, analisaram-se os dados pessoais das 92 pacientes cujas amostras cérvico-vaginais foram utilizadas neste trabalho. Assim foram analisadas no software Epi Info versão 6.0, as seguintes informações: idade, escolaridade, renda familiar, situação marital e raça.

Nas vinte e seis amostras coletadas de pacientes gestantes, a idade média foi de 22 anos, ao passo que nas sessenta e seis amostras coletadas na

população de mulheres com sinais e/ou sintomas de DST, a idade média verificada foi de 27 anos.

Os dados referentes à escolaridade, renda familiar, situação marital e raça estão listados nas Tabelas 7, 8, 9, e 10.

**Tabela 7.** Frequências relativas da escolaridade nas populações de mulheres com sinais e/ou queixas de DST (CDST) e gestantes (CPN).

	<b>CDST</b>	<b>CPN</b>
<b>Escolaridade</b>	<b>Frequência (%)</b>	<b>Frequência (%)</b>
Nenhuma	1 (1,5%)	-
De 1° a 4° série	8 (12,1%)	-
De 5° a 8° série	25 (37,9%)	13 (50,0%)
2° grau	30 (45,5%)	11 (42,3%)
Superior	2 (3,0%)	2 (7,7%)
Não respondeu	-	-

**Tabela 8.** Frequências relativas da renda familiar nas populações de mulheres com sinais e/ou queixas de DST (CDST) e gestantes (CPN).

	<b>CDST</b>	<b>CPN</b>
<b>Renda Familiar (em salários mínimos)</b>	<b>Frequência (%)</b>	<b>Frequência (%)</b>
Menos que 2	17 (25,8%)	10 (38,5%)
De 2 a 4	28 (42,4%)	9 (34,6%)
De 5 a 10	15 (22,7%)	3 (11,5%)
Maior que 10	1 (1,5%)	1 (3,8%)
Não sabe	2 (3,0%)	1 (3,8%)
Não respondeu	3 (4,5%)	2 (7,6%)

**Tabela 9.** Frequências relativas da situação marital nas populações de mulheres com sinais e/ou queixas de DST (CDST) e gestantes (CPN).

	CDST	CPN
Situação Marital	Frequência (%)	Frequência (%)
União estável	35 (53,0%)	17 ( 65,4%)
Solteiro	25 (37,9%)	9 (34,6%)
Separado	5 (7,6%)	-
Viúvo	1 (1,5%)	-
Não respondeu	-	-

**Tabela 10.** Frequências relativas de etnia/cor verificada nas populações de mulheres com sinais e/ou queixas de DST (CDST) e gestantes (CPN).

	CDST	CPN
Etnia/Cor	Frequência (%)	Frequência (%)
Branca	49 (74,2%)	15 (57,7%)
Preta	12 (18,2%)	9 (34,6%)
Amarela	4 (6,1%)	1 (3,8%)
Parda	1 (1,5%)	1 (3,8%)
Indígena	-	-
Não respondeu	-	-

### 5.9 Análise dos Custos e Tempo de Execução das Técnicas Empregadas no Estudo

O custo unitário de cada teste empregado no estudo para a detecção de *C. trachomatis* foi calculado. Da mesma forma, foram comparados os tempos de execução das técnicas (Tabela 11).

No cálculo de custo e do tempo de execução da hibridização estão computadas as etapas de extração, amplificação e eletroforese que antecedem a hibridização propriamente dita. Na técnica de captura híbrida estão

computados gastos e tempo de execução com dois kits, sendo 1) kit CT/GC Screening e 2) kit CT-ID. A técnica de PCR COBAS Amplicor requer do laboratorista pouco mais do que duas horas pois a amplificação e detecção são realizadas em sistema automatizado.

**Tabela 11.** Comparativo entre custos de testes e tempo de execução das técnicas empregadas para detecção de *Chlamydia trachomatis* nesse estudo.

<b>Metodologia</b>	<b>Custo/teste (R\$)</b>	<b>Tempo de execução</b>
Captura Híbrida	51,00	12 horas
PCR	17,30	6 horas
Hibridização	32,00	48 horas
PCR COBAS Amplicor	136,15	8 horas*

\*Tempo de extração de DNA: 2 horas, tempo de amplificação e detecção: 6 horas em automação.

## 6. DISCUSSÃO

A infecção urogenital por *C. trachomatis* é atualmente reconhecida como uma das mais prevalentes infecções sexualmente transmissíveis. Com frequência, *C. trachomatis* supera em números de casos outras DST, como gonorréia e sífilis.

O caráter primariamente assintomático da infecção clamidial tanto em homens como em mulheres constitui-se na base para formação de reservatórios, que perpetuam a transmissão e a aquisição desta e de outras DST. A assintomaticidade em mulheres favorece a evolução da infecção para o trato genital superior, ocasionando seqüelas como a infertilidade. A detecção precoce e o tratamento destas infecções assintomáticas através de programas de *screening* populacionais é a chave no combate a este importante problema de saúde pública.

O mais importante avanço no diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* foi o desenvolvimento de métodos baseados na amplificação de ácidos nucléicos (NAATs). NAATs são mais sensíveis que os testes tradicionais e podem ser utilizados em amostras coletadas de forma não invasiva, o que permite sua utilização no *screening* de indivíduos assintomáticos, o maior contingente de infecções (Stamm, 1999; Gaydos *et al.*, 2002).

O principal entrave na utilização de NAATs no diagnóstico de infecção por *C. trachomatis* nos países em desenvolvimento continua sendo o alto custo dos kits comerciais (Schachter, 2001; George *et al.*, 2003).

O presente estudo teve por objetivo desenvolver e padronizar um teste de detecção de *C. trachomatis* por PCR, submetendo amostras clínicas da população local ao protocolo proposto. A performance do novo teste de PCR *in house* foi avaliada comparativamente com outros testes moleculares de detecção de *C. trachomatis*. Foram avaliados em conjunto dados referentes a outras análises laboratoriais realizadas com amostras das pacientes em estudo, bem como dados pessoais destas.

De acordo com a literatura, a utilização do cultivo celular como padrão-ouro na avaliação de um novo método molecular para detecção de *C.*

*trachomatis* com freqüência subestimava a sensibilidade do novo método proposto (McAdam, 2000; Mahony *et al.*, 2003). O conceito de padrão ouro expandido passou a ser aplicado, com a aprovação de NAATs pelo FDA americano. Este pressupõe a utilização de um sistema de cultivo celular sensível associado a um NAAT comercial regulamentado (Black, 1997; Mahony *et al.*, 2003). Entretanto, com a liberação de diferentes NAATs pelo FDA, tornou-se possível avaliar a performance de um novo NAAT para detecção de *C. trachomatis* associando-se dois ou mais NAATs para instituir o padrão-ouro, sem o uso da cultura (Martin *et al.*, 2004). Sendo mais sensíveis do que o clássico padrão ouro, os novos NAATs apresentam entre si, entretanto, sensibilidade e especificidade variáveis, o que deve influenciar de forma substancial na avaliação da performance de um novo teste.

A escolha dos métodos moleculares utilizados para avaliação da performance do protocolo de PCR *in house* para detecção de *C. trachomatis* foi realizada de acordo com a conveniência e disponibilidade dos mesmos no IPB/LACEN-RS, CDCT, FEPPS. A falta de acesso a métodos de cultivo celular e a disponibilidade de métodos moleculares determinou que o presente protocolo de detecção de *C. trachomatis* fosse avaliado utilizando-se apenas métodos moleculares para tanto. Assim, o protocolo de PCR *in house* foi comparado com a técnica de captura híbrida e com a hibridização. A técnica de hibridização não pôde ser utilizada na composição do padrão-ouro, pois é dependente do novo teste proposto (McAdam, 2000). A identificação de dados clínicos acerca dos pacientes, parâmetro muitas vezes recomendado para compor o “padrão-ouro paciente infectado” (Elder *et al.*, 1997; McAdam, 2000), não pôde ser utilizado uma vez que já sabidamente as infecções genito-urinárias causadas por *C. trachomatis* são na sua maioria assintomáticas e os sinais são, quando existem, inespecíficos. Realizou-se, com isso, a avaliação do método de PCR *in house*, apenas por comparação com os demais métodos.

A PCR detectou uma amostra positiva a mais do que a captura híbrida enquanto que a hibridização detectou 16 amostras positivas a mais do que a PCR. A utilização da detecção por hibridização por *Southern* de produtos de PCR aumenta significativamente a sensibilidade e especificidade dos métodos



de PCR com detecção em gel de agarose. O aumento da sensibilidade é da ordem de uma unidade logarítmica ou mais, o que é particularmente importante em ensaios clínicos desenhados para a detecção direta do agente infeccioso na amostra clínica. Em amostras clínicas, a quantidade de DNA alvo pode ser muito pequena e a quantidade de produto amplificado por PCR pode ser indetectável em gel de agarose corado com brometo de etídeo (Podzorski, 2004). Assim, o incremento no número de amostras positivas após hibridização dos produtos de PCR era esperado.

A maior sensibilidade analítica da hibridização pôde ser confirmada também com o teste do limite de detecção, onde a mesma mostrou detectar a metade do DNA detectado pela visualização em gel de agarose (600 fg). Considerando-se que o genoma de *C. trachomatis* tem 1.042.519 pb e que o plasmídeo críptico apresenta 7493 pb (em média 10 plasmídios por EB = 74930 pb), poder-se-ia realizar o cálculo teórico do número limite de EBs detectáveis (assumindo-se que um mol de pares de bases consiste em média de 686 gramas). Assim, a detecção de 600 fg corresponde a 440 cópias de DNA plasmidial, e, por conseguinte, 44 EBs. O teste do limite de detecção foi realizado com DNA já extraído de *C. trachomatis* diluído em água ultrapura. Um método mais fidedigno do real limite de sensibilidade seria a realização das diluições de corpúsculos elementares (EBs) previamente quantificados e em *pool* de material cérvico-vaginal sabidamente negativo para *C. trachomatis*. O trabalho realizado por Seadi (2002) com os mesmos *primers* CTP1/CTP2, nas condições descritas por Lan *et al.* (1993) detectou até 10.000 cópias de DNA. Considerando-se uma média de 10 cópias de plasmídeo por EB, poder-se-ia extrapolar o limite de detecção de *C. trachomatis* para 1000 EBs (Seadi, 2002).

Ao final de cada ciclo de desenvolvimento, cada célula hospedeira infectada libera de 100 a 1000 EBs para o meio extra-celular (Schachter & Stamm, 1999). Assim, a PCR *in house* teria sensibilidade analítica suficiente para detectar uma infecção.

Todas as 51 amostras positivas por PCR foram confirmadas por hibridização, o que demonstra a especificidade dos *primers* CTP1/CTP2 na amplificação específica do segmento de 201pb do plasmídeo de *C. trachomatis*.

Isto é especialmente relevante em se tratando de ensaios clínicos onde o DNA alvo do agente infeccioso deve ser detectado em meio ao DNA de outros agentes e do próprio hospedeiro. A amplificação de DNAs de diferentes microrganismos da microbiota normal, de agentes etiológicos do trato urogenital e de DNA humano nas condições de reação descritas por Lan *et al.* (1993), demonstrou problemas na especificidade da reação. Esta situação veio a ser contornada com a elevação da temperatura de anelamento dos *primers* chegando-se à especificidade da reação nas temperaturas de 60°C e 66°C, para detecção em gel de agarose e hibridização, respectivamente. Comprovadamente, as amostras em estudo apresentavam diferentes agentes etiológicos, sendo o percentual de outras infecções de 58,69%.

A avaliação do kit Captura Híbrida II CT-ID considerou que o mesmo tem sensibilidade comparável aos NAATs (Girdner *et al.*, 1999). Doze amostras positivas por captura híbrida não foram positivas por PCR *in house*. Destas, sete amostras positivaram após hibridização demonstrando que a hibridização acrescentou sensibilidade na detecção dos produtos amplificados, conforme já referido. Das doze amostras, onze apresentaram RLU/CO inferior a 5,0 (teste é positivo com RLU/CO>1,0), o que demonstra a presença de poucas cópias do DNA alvo. A análise dos resultados discrepantes (CH pos X PCR neg) pelo método de PCR COBAS Amplicor, revelou, porém, a existência de inibidores de reação que poderiam estar associados às amostras, uma vez que dez delas apresentaram inibição do controle interno de reação. A inibição da PCR foi confirmada nas cinco amostras que não positivaram após hibridização, o que já havia sido informado pela análise com a PCR COBAS Amplicor. O percentual de inibição da PCR verificado entre as amostras inicialmente positivas pela captura híbrida foi de 10% e considerando-se a positividade da hibridização foi de 7,5%. Esses dados estão de acordo com os achados de Toye e colaboradores (1998) que determinaram a frequência de inibição de amostras urinárias e genitais com a técnica de PCR COBAS Amplicor.

Dentre as 42 amostras negativas por captura híbrida, 29 permaneceram negativas na PCR *in house* e, destas, nove positivaram para a presença de *C. trachomatis* após hibridização. A análise pela PCR COBAS Amplicor das 13

amostras cujo resultado entre captura híbrida e PCR *in house* foi discordante, concordou com os resultados da captura híbrida indicando tratarem-se de falsos positivos pela técnica de PCR os quais foram igualmente detectados pela hibridização.

A possibilidade de detecção de poucas moléculas de DNA alvo torna a PCR uma técnica delicada do ponto de vista técnico, pois falsos positivos podem ser aventados com a amplificação de quantidades mínimas de DNAs de fontes exógenas. Assim, a presença de *amplicons*, produtos de clonagem e amostras com alto número de cópias do DNA alvo podem comprometer seriamente as análises. Este problema pode ser contornado utilizando-se boas práticas de laboratório, no que se refere à separação das áreas de pré e de pós-amplificação, autoclavagem de reagentes e insumos plásticos, uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) distintos em cada área do laboratório e escolha cautelosa de controles positivos e negativos (Kwok & Higuchi, 1989; Verlengia, *et al.*, 2000).

A contaminação das amostras com produto de PCR *in house* não seria detectada como positiva pela PCR COBAS Amplicor uma vez que a PCR COBAS Amplicor detecta um segmento de DNA distinto daquele detectado pela PCR *in house*. Durante o procedimento de extração de DNA das amostras clínicas, tomou-se o cuidado de manipularem-se amostras em baterias positivas e negativas por captura híbrida, separadamente.

Apesar da forte suspeita de contaminação da PCR nas 13 amostras captura híbrida e PCR COBAS Amplicor negativas, PCR e hibridização positivas, cabe comentar-se a referência à inibição seletiva no kit PCR COBAS Amplicor referida por Berg e colaboradores (2004). Amostras urinárias consideradas inibidas (ausência de amplificação do controle interno) pela PCR COBAS Amplicor foram contaminadas com 50 EBs/mL e novamente submetidas ao teste pela PCR COBAS Amplicor, produzindo resultados negativos válidos (presença de amplificação do controle interno). Os autores concluem que a amplificação seletiva do controle interno poderia estar ocultando amostras inibidas, as quais apresentam pequenas quantidades de *C. trachomatis*. (Berg *et al.*, 2004).

Os resultados obtidos com a técnica de PCR COBAS Amplicor deverão ser avaliados com cautela, pois se utilizou para análise o material coletado com *swab* específico para técnica de captura híbrida. Esta variação no protocolo da PCR COBAS Amplicor poderia estar afetando os resultados de forma substancial, especialmente onde se verificaram tantas reações inibidas.

Com relação à análise da presença de leucócitos polimorfonucleares no esfregaço vaginal corado pelo método de Gram, tentou-se traçar algum paralelo entre este achado e a positividade dos testes para *C. trachomatis* nas amostras cervico-vaginais. A presença de PMNs em 38 das 67 amostras positivas pela hibridização indica que poderia haver associação entre as mesmas (valor de P: 0,06). Este é, no entanto, um achado pouco específico no diagnóstico laboratorial da infecção por *C. trachomatis*, podendo estar presente na vigência de outros agentes causadores de DST.

O grande número de amostras positivas para a presença de *C. trachomatis* e que cujo esfregaço não apresenta qualquer alteração na flora confirma a condição de infecção assintomática atribuída a este agente. O fato de serem escassos os achados laboratoriais que se correlacionem com a presença de infecção por *C. trachomatis* reforça a importância e a necessidade de testes moleculares sensíveis.

Os dados pessoais das pacientes cujas amostras cervico-vaginais foram analisadas foram apresentados a título de informação acerca do perfil humano estudado. A idade média das pacientes de CDST e de CPN foi de 27 e 22 anos, respectivamente. A maioria das pacientes apresentava escolaridade fundamental e média. A renda familiar situou-se abaixo de 5 salários mínimos. A situação marital mais identificada foi a de relação estável tanto em gestantes como em mulheres com sinais e /ou sintomas de DST e a cor/raça mais referida foi branca nos dois grupos.

Com a intenção de avaliar a metodologia de PCR *in house* proposta, foram calculados custos e tempos de execução de cada técnica empregada no estudo. A metodologia de PCR com detecção em gel de agarose apresenta o menor custo em relação as demais metodologias empregadas. Apresenta-se como uma metodologia de rápida execução em relação às demais, excetuando-

se a PCR COBAS Amplicor que, em versão automatizada requer do operador pouco mais do que duas horas de trabalho. O kit COBAS Amplicor é, no entanto o de mais alto custo. A metodologia de captura híbrida apresenta custo e tempo de execução intermediários em relação aos demais métodos. A hibridização apresenta-se como a técnica mais trabalhosa, porém tem baixo custo em relação aos métodos comerciais.

## 7. CONCLUSÕES

A implementação de novos testes para o diagnóstico laboratorial da infecção por *C. trachomatis* em laboratórios da rede pública de saúde é uma necessidade premente. A baixa sensibilidade dos métodos tradicionalmente empregados e o alto custo dos kits comercialmente disponíveis para detecção molecular de *C. trachomatis* têm reforçado a necessidade de pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias locais que utilizem a ferramenta molecular.

O método de PCR para a detecção de *C. trachomatis* proposto neste estudo é uma técnica rápida e de baixo custo para implementação em laboratórios da rede pública. As análises comparativas com outras metodologias moleculares, durante a fase de padronização, demonstram haver concordância entre os resultados, o que pôde ser confirmado estatisticamente.

As técnicas de amplificação de ácidos nucléicos, apesar de serem sensíveis e específicas, estão associadas a problemas técnicos, tais como reações falso-positivas, devido à contaminação da amostra e reações falso-negativas devido à presença de inibidores da reação. Medidas para controlar as vias de contaminação por *amplicons* e DNAs exógenos são imprescindíveis para evitarem-se resultados falso-positivos. Resultados falso-negativos podem ser evitados com a introdução de controles internos de reação, que têm a função de evidenciar a presença de inibidores. Cabe lembrar ainda a necessidade de inclusão de controles positivos e negativos de extração e de reação ao longo de todo o procedimento.

A aquisição e produção de reagentes finais de consumo para utilização em técnicas *in house* deve obedecer a critérios de qualidade para assegurar bons resultados nas análises. Somente o rígido controle da produção em lotes previamente testados pode fornecer resultados reprodutíveis. Assim, para a implementação de técnicas moleculares *in house* em laboratórios clínicos, deve-se procurar observar, sempre que possível, normas de qualidade preconizadas pelas indústrias.

A hibridização dos produtos de PCR com sonda homóloga trouxe um incremento na sensibilidade de detecção da técnica *in house*. A etapa de

hibridização seria recomendável para compor o teste proposto. Esta é uma técnica extremamente laboriosa e demorada, tornando-se difícil sua adequação a laboratórios de rotina. Uma alternativa mais prática e, a princípio, igualmente sensível seria a detecção colorimétrica dos híbridos formados (marcados com biotina) por reação com enzimas como a estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina (Sperhacke *et al.*, 2003).

A PCR em tempo real (*real time* PCR), tecnologia que permite amplificação e análise a um só tempo (Wittner & Kusukawa, 2003), tem-se mostrado como uma metodologia eficiente e confiável no diagnóstico precoce da infecção por *C. trachomatis*. (Eickhoff *et al.*, 2003). A PCR convencional envolve tempo de execução e riscos aumentados de contaminação, pois, para aumentar sensibilidade e especificidade, associa uma etapa de hibridização com grande número de passos até que seja detectado o produto amplificado. Em contraste, a técnica de PCR em tempo real é baseada na contínua detecção dos produtos de amplificação à medida que estes são formados, dentro de tubos, sem a necessidade de abri-los (Eickhoff *et al.*, 2003). A utilização da tecnologia de PCR em tempo real para o diagnóstico de infecções como a *C. trachomatis* deve ser uma alternativa a se considerar tão logo este equipamento esteja acessível aos laboratórios de saúde pública.

## 8. PERSPECTIVAS

Este trabalho representa o primeiro passo no processo de desenvolvimento de um teste molecular de detecção de *C. trachomatis* no IPB/LACEN-RS/CDCT. Tendo em vista os resultados obtidos, as perspectivas para o diagnóstico molecular de *C. trachomatis* são:

- Submeter o protocolo padronizado a amostras urinárias, visando a utilização de amostras não-invasivas em futuros programas de *screening* populacionais.
- Construção de um controle interno para a reação.
- Padronização de um protocolo de detecção colorimétrica dos produtos gerados pela PCR *in house*.



## 9. BIBLIOGRAFIA

Berg, E. S., Størvold. G., Anestad, G., Moi, H, Skaug, K. Reliability of the Amplicor internal control to disclose false-negative *Chlamydia trachomatis* PCR results. **J. Microbiol. Methods.** 60: 125-129, 2004.

Black, C. M. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Clin. Microbiol. Reviews.**1: 160-184, 1997.

Black, C., Morse, S. The use of molecular techniques for diagnosis and epidemiological study of sexually transmitted infections. **Cur. Infect. Dis. Reports.** 2:31-43, 2000.

Chlamydia Genome Project. <http://chlamydia-www.berkeley.edu:4231/index.html>.

Centers for Disease Control and Prevention. **Sexually Transmitted Disease Surveillance** Department of Health and Human Services, Atlanta, GA: US, 2002.

Centers for Disease Control and Prevention. Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. **Morbidity and Mortality Week Report.** Department of Health and Human Services. Atlanta, GA: US, 2002.

Corsaro, D., Valassina, M., Venditti, D. Increasing diversity within *Chlamydiae*. **Critical Reviews in Microbiology**, 29 (1): 37-78, 2003.

Coutlée, F.; Gravitt, P.; Kornegay, J.; Hankins, K.; Richardson, H.; Lapointe, N.; Voyer, H.; The Canadian Women's HIV Study Group; Franco, E. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. **J. Clin. Microbiol.** 40(3): 902-907, 2002.

Dallabetta, G.; Laga, M. and Lamptey, P. Controle de doenças sexualmente transmissíveis. **Manual de Planejamento e Coordenação de Programas**. Associação Saúde da Família. São Paulo, 1996.

Darwin, L. H., Cullen, A. P., Arthur, P. M., Long, C. D., Smith, K. R., Girdner, J. L., Hook III, E. W., Quinn, T. C., Lorincz, A. T. Comparison of Digene Hybrid Capture 2 and conventional culture for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. **J. Clin. Microbiol.** 40(2): 641-644, 2002.

Eickhoff, M., Laue, T., Ruckes, T. , Cramer, S. Krupp, G., Tiemann, K. Ultra-rapid detection of *Chlamydia trachomatis* by Real-time PCR in the Lightcycler using SYBR green technology or 5'nuclease probes. **Clin. Lab.** 49:217-225, 2003.

Elder, B.L., Hansen, S. A., Kellog, J. A., Marsik, F.J., Zabransky, R. Verification and validation of procedures in the clinical microbiology laboratory. In: **Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology**. Washington: ASM Press, 31,1997.

Farencena, A., Comanducci, M., Donati, M., Ratti, J., Cevenini, R. Characterization of a new isolate of *Chlamydia trachomatis* which lacks the common plasmid and has properties of biovar Trachoma. **Infection and Immunity.** 65(7): 2965-2969, 1997.

Francisco, W. Gonococcias e Clamídias. In: Ferreira, A W. & Ávila, S. L. M. **Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996: 101-108.

Gaydos, C. A. & Rompalo, A. M. The use of urine and self-obtained vaginal swabs for the diagnosis of sexually transmitted diseases. **Current Infectious Disease Reports**, 4:148-157, 2002.

George, J. A. Panchatcharam, T. S., Paramasivam, R., Balasubramanian, S., Chakrapani, V., Murugan, G. Evaluation of diagnostic efficacy of PCR methods for *Chlamydia trachomatis* Infection in genital and urine specimens of symptomatic men and women in India. **Jpn. J. Infect. Dis.** 56: 88-92, 2003.

Girdner, J., Cullen, A. P., Salama, T. G., He, L., Lorincz, A., Quinn, T. C. Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Test for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens. **J. Clin. Microbiol.** 37(5): 1579-1581, 1999.

Griffais, R. & Thibon, M. Detection of *Chlamydia trachomatis*. **Res. Microbiol.** 140: 139-141.

Hogan, R. J., Mathews, S. A.; Muckopadhyay, S.; Summerhill, J. T.; Timms, P. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. **Infection and Immunity.** 72: 1843-1855, 2004.

[http://who.int/hiv/topics/me/sti\\_surveillance](http://who.int/hiv/topics/me/sti_surveillance)

Kwok, S. & Higuchi, R. Avoiding false positives with PCR **Nature**, 339: 237-238, 1989.

Lan, J., Walboomers, J. M. M., Roosendaal, R. Doornum, G. J. J; Mac Laren, D. M.; Meijer, C. J. L. M.; van der Brule, A. J. C. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. **J. Clin. Microbiol.** 31(5): 1060-1065, 1993.

Livengood, C. and Wrenn, J. Evaluation of Cobas Amplicor (Roche): accuracy in detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by coamplification of endocervical specimens. **J Clin Microbiol.** 39(8): 2928-2932, 2001.

Loeffelholz, M. J., Lewinski, C. A., Silver, S. R., Purohit, A. P., Herman, S. A. Buonagurio, D. A., Draon, E. A. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical specimens by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.** 30: 2847-2851, 1992.

McAdam, A. J. Discrepant Analysis: How can we test a test? **J. Clin. Microbiol.** 38: 2027-2029, 2000.

Mahony, J. B., Coombes, B. K., Chernesky, M. A. *Chlamydia* and *Chlamydothila*. In: **Manual of Clinical Microbiology**. 63. 8 ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2003: 991-1004.

Mahony, J.B., Luinstra, K.E., Sellors, J. W., Chernesky, M.A. Comparison of plasmid- and chromosome-based Polymerase Chain Reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, 31: 1753-1758, 1993.

Mardh, P. Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. **Current Opinion in Infectious Disease.** 17: 49-52, 2004.

Martin, D. H., Malanda, N., Schachter, J. Hook III, E. W., Ferrero, D., Quinn, T. Gaydos, C. Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient "Gold Standard" in clinical trials of new diagnostic tests for *Chlamydia trachomatis* infections. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 4749-4758, 2004.

Miranda, A. E., Szcwarcwald, C. L., Peres, R. L., Page-Shafer, K. Prevalence and risk behaviors for chlamydial infection in a population-based study of female adolescents in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases.** 31(9): 542-546, 2004.

Miyashita, N. Matsumoto, A., Fukano, H. Niki, Y., Matsushima, T. The 7,5-Kb common plasmid is unrelated to the drug susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. **J. Infect. Chemother.** 7: 113-116, 2001.

Moulder, J. W. Order *Chlamydiales* and family *Chlamydiaceae*. In: Krieg, N. R. & Holt, J. G. (ed.) ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***, vol.1 The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., 1984.

Nolte, F., Caliendo, A. Molecular Detection and Identification of Microorganisms. In: ***Manual of Clinical Microbiology***. 17. 8 ed. Washington, D.C.: ASM Press, 234-256, 2003.

Numazaki, K. Serological tests for *Chlamydia trachomatis* infections. ***Clin. Microbiol. Rev.***, 11: 228-229, 1998.

Podzorski, R. Gel eletrophoresis, southern hybridization and restriction length polymorfism analysis. In: Persing, D.; Tenover, F.; Versalovis, J.; Tang, Y; Unger, E.; Relman, D.; White, T. eds. ***Molecular Microbiology - Diagnostic Principles and Practice*** Washington: ASM Press, 2003: 273-280.

Pudjiatmoko, H., Fukushi, Y, Ochiai, Y., Yamaguchi, T., Hirai, K. Phylogenetic analysis of the genus *Chlamydia* based on 16 S rRNA gene sequences. ***Int. J. Syst. Bacteriol.*** 23: 924-928, 1997.

Ramos, M. C., Becker, D., Perin, M. T., Malheiro, A. D., Ritter, A. T., Gyrão, N., Cestari, T. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples of men with urethrites in a public STI clinic in Porto Alegre, Brazil. ***Int. J. STD and AIDS***; 13(1): 47, 2002.

Ramos, M. C., Becker, D., Germany, C. Estudo populacional de prevalência de *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* pela Reação em Cadeia da Polimerase em amostras de urina de mulheres residentes em vila popular na cidade de Porto Alegre, Brasil. ***J. Bras. DST***, 15(2): 12, 2003.

Sambrook, J., Russel, D. W. ***Molecular Cloning. A laboratory manual.*** 3<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001.

Santos, C., Teixeira, F., Vicente, A, Astolfi-Filho, S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. ***The Brazilian J. of Infectious Diseases***, 7(2): 91-95, 2002.

Seadi, C. M. F. Detección de *Chlamydia trachomatis* por la técnica de PCR en muestras clínicas.(**Tese**) León, Universidad de León, 2002.

Schachter, J., Hook III, E. W., McCormack, W. M., Quinn, T. C., Chernesky, M., Chong, S., Girdner, J., Dixon, P., DeMeo, L., Williams, E., Cullen, A., Lorincz, A. Ability of the Digene Hybrid Capture II Test to identify *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in cervical specimens. ***J. Clin. Microbiol.***, 37(11): 3668-3671, 1999.

Schachter, J., Stamm, W. Chlamydia. In: ***Manual of Clinical Microbiology.*** 57.7.ed. Washington, D.C. ASM Press. 795-806, 1999.

Schachter, J., McComack, W., Chernesky, M.A., Martin, D., van der Pol, B., Rice, P., Hook III, E., Stamm, W., Quinn, T., Chow,J. Vaginal swabs are appropriate specimens for diagnosis of genital tract infection with *Chlamydia trachomatis*. ***J. Clin. Microbiol.*** 41: 3784-3789,2003.

Schachter, J. NAATs to diagnose *Chlamydia trachomatis* genital infection: a promise still unfulfilled. ***Expert Rev. Mol. Diagn.*** 1(2): 137-144, 2001.

Shafer, M.A., Moncada, J., Boyer, C. B., Betsinger, K., Flin, S., Schachter,J. Comparing first-void urine specimens self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by nucleic acid amplification test. ***J. Clin. Microbio.*** 41(9): 4395-4399, 2003.

Sperhacker, R. D. Mello, F.C.Q., Zaha, A, Kritski, A, Rossetti, M. L. R. Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. **Int. J. of Tuberc. and Lung Dis.** 8(3): 312-317, 2004.

Sousa, A. E. S., Gurgel, A, Sousa, J. A Reiter's syndrome: a case report. **An. Bras. Dermatol.**, 78(3):323-30, 2003.

Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Clin Microbiol.**, 98: 503-517, 1975.

Stamm, W. E. *Chlamydia trachomatis* infections: Progress and Problems. **J. Infect. Diseases.** 179: 380-383, 1999.

Strydom, A. Correct samples for diagnostic tests in sexually transmitted diseases: which sample for which test? **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 24: 455-459, 1999.

Stephens, R. S.; Kalman, S.; Lammel, C.; Fan, J.; Marathe, R.; Aravind, L.; Mitchell, W.; Olinger, L.; Tatusov, R. L.; Qixun, Z.; Koonin, E. V. Genome Sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. **Science.** 282: 754-759, 1998.

The comprehensive reference and education site to *Chlamydia* and the *Chlamydiae*. [www.chlamydiae.com](http://www.chlamydiae.com).

Thomas, N. S.; Luscher, M.; Storey, C. C.; Clarke, I. N. Plasmid diversity in *Chlamydia*. **Microbiology.** 143: 1847-1854, 1997.

Verlengia, R., Hirata, R. D. C. Hirata, M. Prevenção e controle da contaminação nas reações de amplificação de ácidos nucléicos. **NewsLab**, 43:69-80,2000.

Toye, B.; Woods, W.; Bobrowska, M.; Ramotar, K. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. **J. Clin. Microbiol.**, 36: 2356-2358, 1998.

van Der Pol, B.; Williams, J. A.; Smith, N. J.; Batteiger, B. E.; Cullen, A. P.; Erdman, H.; Edens, T.; Davis, K.; Salim-hammad, H.; Chou, V. W.; Searce, L.; Blutman, J.; Payne, W. J. Evaluation of the Digene Hybrid Capture II Assay with the rapid capture system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **J. Clin. Microbiol**, 40 (10): 3558-64, 2002.

van Soolingen, D, De Hass, P. E. W., Hermans, P. W. M., van Embden, J. D. A. Isolation of genomic DNA from *Mycobacteria*. In: **RFLP Analysis of Mycobacteria**. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Beethoven, The Netherlands, p. 5-10, 1994.

Warford, A., Chernesky, M, Peterson, E. M. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology**. Washington, D. C. ASM Press, 19<sup>A</sup>: 2-18, 1999.

Wittwer, C., Kuskawa, N. Real-time PCR In: Persing, D.; Tenover, F.; Versalovis, J.; Tang, Y; Unger, E.; Relman, D.; White, T. eds. **Molecular Microbiology - Diagnostic Principles and Practice**. Washington: ASM Press, 2003: 71-84.



## 10. ANEXOS

## 10.1 Soluções e Tampões.

### **-Solução de desnaturação**

NaCl 1,5M  
NaOH 0,5M

### **-Solução de neutralização**

NaCl 1,5M  
Tris HCl 1,0M  
pH 7,5

### **-Solução de transferência**

SSC 10x

### **-SSC 20x**

NaCl 3M  
Na Citrato 0,3M  
pH 7,0

### **-Tampão de amostra 5x**

Ficoll 400 15%  
Xileno cianol FF 0,25%  
Azul de bromo fenol 0,25%

### **-Tampão de lavagem primária**

uréia 36%  
SDS 4%  
SSC 20x

### **-Tampão de lavagem secundária**

SSC 2x

### **-Tampão 10 x de reação**

Tris HCl 10mM (pH 8,3)  
KCl 50mM  
Gelatina 0,1% (W/V)

### **-Tampão TEB ( Tris-borato-EDTA) 1x**

Tris HCl 890mM  
EDTA 2,5mM  
Ácido Bórico 890mM  
pH 8,2

## 10.2 Manuscrito

**Detection of *Chlamydia trachomatis* by Polymerase Chain Reaction in Cervical Specimens**

Daniela Becker<sup>1,2</sup>; Alzira Resende do Carmo Aquino<sup>1</sup>; Livia Kmetzsch Rosa e Silva<sup>1</sup>; Naíla do Nascimento<sup>1</sup>; Maria Lúcia Rosa Rossetti<sup>1,2</sup> & Marilene Henning Vainstein<sup>1\*</sup>

1-Centro de Biotecnologia – UFRGS; 2-Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul-Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre-Rio Grande do Sul, Brazil.

\*Correspondence and reprints: Marilene Henning Vainstein at Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, P. O. Box 15005, 90540-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone (051) 3316-6060

E-mail: mhv@cbiot.ufrgs.br

Fax (051) 3316-7309

## Abstract

An in house plasmid-based polymerase chain reaction test (PCR) was established to detect DNA of *Chlamydia trachomatis* in cervical specimens. Specific primers for the cryptic plasmid of *C. trachomatis* were designed to amplify a 201pb fragment. The specificity of the primers was determined by submitting to the intended protocol, the DNA of normal and abnormal urogenital microbiota. The detection limit of the PCR and the Southern blot hybridization (HYBR) was determined. Enzymatic cleavage and automatic sequencing confirmed the 201pb-amplified sequence. Ninety-two specimens were submitted to the plasmid-based PCR (PCR), Southern Hybridization (HYBR) and the Digene Hybrid Capture II kit (Digene Inc., Gaithersburg, Md.) (HC). The COBAS Amplicor (Roche Diagnostics Systems, Branchburg, N.J.) was used to resolve discrepant results. Fifty-one specimens gave positive results by PCR, whereas HC and HYBR detected, respectively, 50 and 67 positive specimens. All specimens PCR positive gave positive results by HYBR. The concordance between PCR and HC; HC and HYBR; PCR and HYBR was moderated: 0.45 (SD 0.093), 0.39 (SD 0.091), 0.634 (SD 0.077). The two-sided McNemar test indicated concordance between all methods ( $P < 0.001$ ). The results show that the in house plasmid-based PCR is rapid, cheap, relatively sensitive and specific test for the detection of *C. trachomatis* DNA in cervical specimens.

**Keywords:** polymerase chain reaction, *Chlamydia trachomatis*, detection; cervical specimens

## Introduction

*Chlamydia trachomatis* is the most common bacterial sexually transmitted disease (STD) in the world (Warford, 1999). While the clinical presentation in men is mild, women suffer more serious complications with the ascendant infection, causing pelvic inflammatory disease (PID), ectopic pregnancy, and tubal infertility (Paavonen & Eggert-Kruce, 1999). The biggest challenge to the control of chlamydial disease is related to the absence of symptoms in 70 to 80% of the infected women and up to 50% of infected men (Black, 1997). Cell culture was long the gold standard for diagnosis of *C. trachomatis* infections because of its absolute specificity. However, due to its labor-intensive methodology, costs and turnaround time, cell culture was limited to specialized research laboratories only. Other non-cultured tests, such as direct immunofluorescence assay (DFA) and enzyme immunoassay (EIA) lack the high sensitivity and specificity needed for accurate diagnosis of ongoing infection (Black, 1997). Nucleic acid amplification methods, mainly represented by polymerase chain reaction (PCR), have reported to offer improved performance over those conventional methods (Black, 1997; Stamm, 1999).

Despite the wide availability of commercial nucleic acid amplification tests (NAAT) and their routine use in most of the industrialized countries in recent years, they still remain inaccessible to developing countries like Brazil, due to its high costs.

Most of the commercial NAAT for the detection of *C. trachomatis* are based on the cryptic plasmid, considered an excellent target for diagnostic tests. This 7500bp plasmid is highly conserved in *C. trachomatis* species (less than 1% variability) and is presented in 7-10 copies/EB (elementary body) (Thomas *et al.*, 1997). Mahony *et al.* (1993) compared different PCR procedures to identify *C. trachomatis* concluding that plasmid-based PCR tests are 10 to 1000 times more sensitive than chromosome-based PCR tests. The present study was conducted to develop an in house plasmid-based PCR for the detection of *C. trachomatis* DNA in cervical specimens.

## Material and Methods

**Specimens.** Ninety-two cervical specimens were obtained from a collection of the Prevalence and Relative Frequencies of STD National Survey, collected from August to December 2003. Specimens were collected with a Dacron swab, placed in 1 mL Specimen Transport Medium (Digene Diagnostics) and kept under -20°C until processing. Sixty-six specimens were from women attending a STD clinic and 26 were from pregnant patients attending a pre-natal clinic.

**Hybrid Capture.** Processing of specimens with the Hybrid Capture II CT/GC and Hybrid Capture II CT-ID was done according to the manufacturer's package insert.

**PCR COBAS Amplicor.** The PCR COBAS Amplicor (Roche) was used for discrepant analysis. Briefly, 500µL of specimen collected in Specimen Transport Medium (STM – Digene) were placed on a microtube and washed with 500µL of Wash Buffer (Roche). The following procedures were done according to the manufacturer's recommendations.

**Detection of *C. trachomatis* by plasmid-based PCR.** For DNA extraction 500µL of each specimen collected in Specimen Transport Medium (STM–Digene) were submitted to the Ultra Clean Tissue DNA Isolation kit (Mbio Laboratories Inc.), according to the manufacturer's package insert. The primers used for generating a 201-bp fragment of the *C. trachomatis* cryptic plasmid were CTP1(5'- TAG TAA CTG CCA CTT CAT CA -3') and CTP2 ( 5'-TTC CCC CTT GTA ATT TCG TTG C- 3') (Griffais & Thibon, 1989). PCR was performed with a final volume of 50µL containing final concentrations of 50mM KCl, 3.0mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM tris-HCl (pH 8.3), 200µM each deoxynucleoside triphosphate

(dATP, dTTP, dGTP and dCTP), 12.5 pmol each primer, and 1 U of Taq polymerase (Gibco, BRL, Life Technologies). The PCR amplification consisted of DNA denaturation at 95°C for 4 min followed by 40 cycles of amplification in a thermocycler (MJ Research PTC 96). Each cycle consisted of a denaturation step at 95°C for 1 min, an annealing step at 66°C for 1min, and a chain elongation step at 72°C for 1.5 min. The final elongation step was extended for another 4 min. Samples containing only the PCR mixture were used as negative control. *C. trachomatis* serovar L2 DNA was used as positive control. Finally, 15 µL of the PCR product was analyzed in a 1.5% agarose gel electrophoresis followed by Southern-blot hybridization. The DNA was transferred from an agarose gel onto a nylon membrane (Hybond-N Amersham) by diffusion blotting. The blot was hybridized with homologous probe, previously prepared and purified with kit Microspin S-300 HR Columns (Amersham Biosciences). The kit ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems (Amersham Biosciences) was used to label the probe. Hybridization was carried out overnight at 42°C in gyratory oven (Hybaid Instruments, Holbrook, NY). The luminescent signal was detected by autoradiography (Hyperfilm, Amersham Biosciences).

**Determination of Sensitivity and Specificity.** The specificity of primers CTP1 e CTP2 was tested by amplification of DNA of microorganisms from female normal genital microbiota, pathogenic agents and human DNA. The DNA of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* and *Lactobacillus* sp. was extracted and purified by the CTAB (cetil-trimetil-amonium chloride) method (van Soolingen *et al.*, 1994). Human Papillomavirus (HPV) 16 and 33 sub-types DNA were obtained by Proteinase K lyses (Coutlée *et al.*, 2002). Human DNA was purified with DNazol (Gibco-BRL, Life Technologies). DNAs were quantified at 260nm (Genequant, Pharmacia Biotech) and diluted to 100ng/µL. The detection limit of the plasmid-based PCR was determined in *C. trachomatis* Serotype L2 DNA dilutions of 30pg/µL to 60fg/µL in agarose gel and Southern-hybridization.

**DNA cleavage and sequencing.** The *C. trachomatis* specific sequence of 201bp was confirmed by EcoRV cleavage. The reaction mixture consisted of buffer 10x (Tris HCl 50mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, NaCl 50mM), EcoRV (10U/µL), and 100ng/µL amplification product. Reaction was carried out overnight at 37°C and the cleavage products were checked by agarose 3.0% gel electrophoresis. The 201bp product was purified (Microspin S-300 HR Columns, Amersham Pharmacia Biotech) and prepared for sequencing with kit BigDye Terminator Cycle Sequencing v 1.1 Ready Reaction (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations. The automatic sequencing was carried out in the ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) analyzer. The sequences obtained were analyzed by software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

**Data Analysis.** All results obtained by HC, PCR and HYBR were analyzed by the SPSS for Windows version 10.0. The kappa statistic was calculated to determine the level of agreement between pairs of assay methods. In general, kappa values of 0.0 to 0.30, 0.31 to 0.60, 0.61 to 0.90, and >0.91 indicate poor or slight, moderate, high and almost perfect agreement, respectively ([www.cmh.edu/stats/definitions/kappa.htm](http://www.cmh.edu/stats/definitions/kappa.htm)).

## Results

### Confirmation of the 201bp fragment sequence

The unique restriction site of EcoRV originated two fragments of 130bp and 71bp as expected to confirm the 201bp sequence of the cryptic plasmid of *C. trachomatis*. The analysis of the automatic sequencing showed 100% homology with the deposited GenBank sequence (Access number AE001273).

### Detection Limit and Specificity of the in house plasmid-based PCR

The detection limit of the in house plasmid-based PCR in agarose gel electrophoresis was 600 fg/ $\mu$ L and after hybridization, the detection limit achieved 300 fg/ $\mu$ L (results not shown). The expected 201 bp product was only obtained with *C. trachomatis* DNA and no amplification products were obtained with other DNA samples. Specific amplification with primers CTP1 and CTP2 was therefore confirmed (results not shown).

### Comparative Analysis of the in house plasmid-based PCR, hybrid capture and hybridization.

Ninety-two cervical specimens were analyzed to detect *C. trachomatis* by in house plasmid-based PCR (PCR), Southern hybridization following the PCR (HYBR) and hybrid capture II (Digene) (HC). PCR detected 51 positive specimens (Fig. 1) while HC and PCR followed by HYBR detected 50 and 67 positive specimens, respectively. From 51 PCR positive specimens, 38 were confirmed by HC, while PCR followed by HYBR confirmed all 51 specimens as positive. Twelve specimens were positive by HC and negative by PCR, however 7 of them were positive after HYBR. Five specimens remained negative after HYBR. DNA extractions of these specimens were spiked with 600fg/ $\mu$ L *C. trachomatis* DNA. The absence of amplification in the five samples confirmed the presence of inhibitory factors. Twenty-nine specimens were confirmed as negative by PCR and HC. After HYBR, 9 specimens were positive and 20 remain negative to the presence of *C. trachomatis*. Thirteen out of 42 HC negative specimens gave positive results by PCR and HYBR. The concordance between PCR and HC; HC and HYBR; PCR and HYBR was moderated: 0.45 (SD 0.093), 0.39 (SD 0.091), 0.634 (SD 0.077). The two-sided McNemar test indicated concordance between all methods ( $P < 0.001$ ).

### Discrepant analysis by COBAS Amplicor PCR (Roche)

PCR COBAS Amplicor was used to resolve discrepant results. From twelve HC positive and PCR negative specimens, 10 showed internal control inhibition and only two gave valid results (one positive and one negative). PCR COBAS Amplicor confirmed all 13 HC negative and PCR positive specimens, as negative.

## Discussion

In this paper we proposed an in house plasmid-based PCR for the detection of *C. trachomatis* in cervical specimens. The comparative analyses using two other molecular techniques showed statistic moderate agreement.

PCR detected one more positive specimen than HC, while HYBR was positive in more 16 specimens. The use of Southern Hybridization after PCR reaction increases sensitivity and specificity to detect amplification products. The analytical sensitivity of HYBR was confirmed as well by the detection limit test, which achieved half amount of DNA detected by agarose gel (600fg).

All 51 positive specimens detected by PCR were confirmed by HYBR, demonstrating the specificity of primers CTP1 and CTP2 in amplifying the *C. trachomatis* cryptic plasmid segment of 201bp. This is especially relevant in case of clinical assays where target DNA should be detected among DNA of several other microbial agents, as



well as of the host cells. The primers specificity was confirmed also by submitting to amplification DNA of normal and abnormal female microbiota, and human DNA. STD suspected specimens are highly contaminated and in this study fifty-four specimens were contaminated with other etiologic agent, out of a total of ninety-two.

Twelve discrepant specimens (HC positive, PCR negative) were analyzed by using PCR COBAS Amplicor (PCR). A high rate of inhibition was detected, since 10 specimens did not produce internal control amplification. This fact could explain these negative results by PCR, which could have been due to partial inhibition in seven specimens, detected by HYBR. In this study, the rate of inhibition was 7.5%, considering the HIBR positivity. This data are consistent with Toye *et al.* (1998), which assessed the frequency of inhibition in urinary and genital specimens submitted to the PCR COBAS Amplicor (Roche) (Toye *et al.*, 1998).

From 42 negative HC specimens, 29 remain negative when tested by PCR, but 9 out of 29 produced positive results after HYBR. The thirteen discrepant specimens (HC x PCR) showed negative results when submitted to the PCR COBAS Amplicor, indicating a possible contamination.

The HYBR step would be recommended to be used complementary to the PCR. It is, however, time-consuming and labor-intensive and its implementation in routine laboratories is difficult.

The development of in house PCR protocols for the diagnosis of infectious diseases is a good alternative to public health laboratories due to its low costs and relatively simple structure requirements. Nevertheless, precautions regarding contamination should be taken to avoid false-positive results. Separations of areas as well as the instrumentation are good practices to be adopted in molecular diagnostics laboratories (Kwok & Higuchi, 1989; Verlengia, *et al.*, 2000). False-negative results may also occur due to the presence of inhibitory substances in the sample. To avoid this, internal controls should be used to monitor reaction conditions.

Our results do not indicate that in house plasmid-based PCR method would improve ability to diagnose clamidial infections compared to the commercial molecular kits available. However, it presents some advantages over usual methods currently used in public health laboratories. It is rapid, cheap and easy to implement in small routine laboratories and might be useful as confirmatory method to conventional diagnostic techniques.

## References

- Black, C. M. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Clin. Microbiol. Reviews.1: 160-184, 1997.
- Coutlée, F., Gravitt, P., Kornegay, J., Hankins, K.; Richardson, H.; Lapointe, N.; Voyer, H.; The Canadian Women`s HIV Study Group; Franco, E. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of Human Papillomavirus DNA in genital samples. J. Clin. Microbiol.40(3): 902-907, 2002.
- Griffais, R., Thibon, M. Detection of *Chlamydia trachomatis*. Res. Microbiol. 140: 139-141, 1989.
- Kwok, S., Higuchi, R. Avoiding false positives with PCR. Nature, 339: 237-238, 1989.
- Lan, J., Walboomers, J. M. M., Roosendaal, R., Doornum, G. J. J, Mac Laren, D. M., Meijer, C. J. L. M., van der Brule, A. J. C. Direct detection and genotyping of *Chlamydia trachomatis* in cervical scrapes by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorfism analysis. J. Clin. Microbiol., 31(5): 1060-1065, 1993.
- Mahony, J. B., Luinstra, K. E., Sellors, J. W., Chernesky, M. A. Comparison of plasmid- and chromosome-based Polymerase Chain Reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. J. Clin. Microbiol, 31: 1753-1758, 1993.
- Paavonen, J., Eggert-Kruce, W. *Chlamydia trachomatis*: impact on human reproduction. Hum. Repr. Update 5: 433-447, 1999.
- Stamm, W.E. *Chlamydia trachomatis* infections: Progress and Problems. J. Infect. Diseases 179: 380-383, 1999.
- Thomas, N. S.; Luscher, M.; Storey, C. C.; Clarke, I. N. Plasmid diversity in *Chlamydia* Microbiology, 143: 1847-1854, 1997.
- Toye, B.; Woods, W.; Bobrowska, M.; Ramotar, K. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. J. Clin. Microbiol., 36: 2356-2358, 1998.
- van Soolingen; D., De Hass, P. E. W.; Hermans, P. W. M.; van Embden, J. D. A. Isolation of genomic DNA from Mycobacteria. In: RFLP Analysis of Mycobacteria. National institute of Public Health and Environmental Protection, Beethoven, The Netherlands, 5-10, 1994.
- Verlengia, R., Hirata, R. D. C. Hirata, M. Prevenção e controle da contaminação nas reações de amplificação de ácidos nucléicos. NewsLab, 43: 69-80, 2000.
- Warford, A.; Chernesky, M., Peterson, E. M. Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology. Washington, D. C. ASM Press, 19A : 2-18, 1999.

**Tabel 1:** Comparison of the results obtained with the methods used to detect *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens.

Hybrid Capture		PCR (detection in gel)		Hybridization	
POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
50		38	12	38	5
	42	13	29	9	20
				13	



**Figure 1:** Eletrophoretic analysis in 1.5% agarose gel of PCR products obtained with primers CTP1/CTP2 in clinical specimens. 1: 100 bp ladder. 2-6: Hybrid Capture positive specimens. 7-12: Hybrid Capture negative specimens. 13: negative control. 14: positive control.