



DETECÇÃO DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS EM AMOSTRAS CERVICAIS ATRAVÉS DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Alisson Messalas Vargas Faria¹
Vera Mileide Trivellato Grassi²
Márcia Susana Nunes Silva³

Resumo

Chlamydia trachomatis (CT) é o agente etiológico mais prevalente em infecções sexualmente transmissíveis (IST) no mundo, podendo causar infertilidade no sexo masculino e feminino. Além disso, tem uma alta prevalência de casos assintomáticos, o que o torna um sério problema para a saúde da população. O presente estudo tem como objetivo detectar a presença da *C. trachomatis* em amostras cervicais de mulheres com resultados sorológicos positivos e negativos para o vírus HIV. Para isto, a amplificação de DNA da *C. trachomatis* foi feita através da utilização da reacção em cadeia da polimerase.

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

INTRODUÇÃO

Chlamydia trachomatis (CT) é o agente etiológico mais prevalente em infecções sexualmente transmissíveis (IST) no mundo (MACLEOD et al., 1999), podendo causar infertilidade no sexo masculino e feminino, doença inflamatória pélvica e gravidez ectópica (COSTA-LIRA et al., 2017; KECK et al., 1998). Um dos problemas da infecção por CT é a alta prevalência de casos assintomáticos, fazendo com que a pessoa infectada dissemine o patógeno sem ter ciência de tal fato (DEAN et al., 2009). Tais agravantes fazem da detecção do patógeno uma importante estratégia para controle e detecção da doença.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a cada ano ocorram em torno de 92 milhões de novos casos de CT, dos quais a maioria é observada em países em desenvolvimento, afetando principalmente adolescentes e jovens (PIAZZETTA et al., 2011).

¹ Graduando em biomedicina- Bolsista FAPERGS - Alissonfaria27@hotmail.com

² Mestranda no PPGBiosáude – Vmgrassi@hotmail.com

³ Professora do curso de graduação de Biomedicina/Farmácia e PPGBiosáude – Marcia_Susana@hotmail.com

No Brasil, calcula-se que ocorram cerca de 1.967.200 novos casos de *C. trachomatis*, embora não esteja incluída entre as ISTs de notificação compulsória. Estudos estimam que a infecção por *CT* na população brasileira varie de 9,1-14,3% (COSTA-LIRA et al., 2017).

Neste trabalho foi utilizada a reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar a presença da *CT* em amostras cervicais de mulheres com o vírus HIV positivo (125) e negativo (82), atendidas em um Centro de Testagem e Aconselhamento/Serviço de Assistência Especializada (CTA/SAE) de Caxias no estado do Maranhão.

Este estudo tem como objetivo detectar a presença da *C. trachomatis* em amostras cervicais de mulheres com resultados sorológicos positivos e negativos para o vírus HIV.

METODOLOGIA

Foi utilizado um total de 207 amostras cervicais de mulheres atendidas no CTA/SAE de Caxias no estado do Maranhão com resultados sabidamente positivos e negativos para o HIV, através dos testes sorológicos. Destas, 125 são amostras HIV positivas e 82 negativas.

A extração de DNA das amostras foi realizada conforme protocolo adaptado de MOREIRA et al (2010).

Resumidamente, foram separados 200 µL de soro em microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 500 µL de tampão PBS (tampão fosfato pH = 6,8) com posterior agitação no vórtex e centrifugação de 10 minutos a 3.000 rpm. Em seguida, foi retirado e desprezado o sobrenadante. No eppendorf com sedimento, foram adicionados 100 µL de água ultrapura e passado os tubos no vórtex até desmanchar o botão. Por conseguinte, foi levado ao banho seco por 20 min a 95°C. Após, foi colocado no banho de ultrassom durante 10 minutos a 30°C e centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm. Em seguida, retirou-se o sobrenadante (onde está o DNA) para novos tubos. Posteriormente, este DNA extraído foi utilizado na realização da técnica de PCR.

A amplificação foi realizada utilizando os primers CTP1 e CTP2 que amplificam um segmento de 201pb da ORF de número 4 do plasmídeo críptico da *C. trachomatis* como descrito por LAN et al. (1993).

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

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

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

O resultado da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 0,05% de brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

O controle positivo usado na reação foi o próprio DNA da *C. trachomatis* e o negativo uma mistura dos componentes da reação, livre de DNA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo ainda se encontra em andamento, porém até o presente momento, do total de 207 amostras, 125 HIV positiva e 66 de um total de 82 HIV negativas já foram amplificadas. Os resultados mostraram que das 125 HIV positivas, 21 (16,8%) apresentaram a presença de CT e, no caso das 66 HIV negativas, 12 (18%) apresentaram a presença de CT e 54 (82%) não foi detectado a CT. Ressalta-se que ainda está em andamento a amplificação das amostras HIV negativas.

Os estudos sobre as prevalências das ISTs têm aumentado nos últimos anos, tanto no Brasil, quanto no mundo. Historicamente, apresentam-se como um grande desafio para o diagnóstico por testes laboratoriais, tanto pela dificuldade na obtenção de amostras clínicas, que muitas vezes é invasiva e dolorosa, quanto pelo inconveniente de obter o cultivo como é o caso da *C. trachomatis*. Entretanto, com o desenvolvimento dos testes de amplificação de ácidos nucleicos, que são mais sensíveis que os tradicionais, eliminou-se a necessidade do cultivo bacteriano possibilitando um diagnóstico através do uso de amostras colhidas por métodos pouco invasivo, como as amostras cervicais (KOKSAL et al., 2016; MIRANDA et al., 2017).

No Brasil a infecção por *C. trachomatis* não é uma doença de notificação compulsória e, portanto, são poucos os dados confiáveis sobre a real prevalência da mesma. Também não existem programas específicos do Ministério da Saúde (MS), que incentivem o rastreamento, e por ser assintomática na maior parte dos casos, provavelmente é subdiagnosticada. Além disso, é pouco tratada, o que pode justificar os altos índices encontrados, até o

momento, neste estudo. As estimativas de prevalência da *C. trachomatis* devem ser interpretadas levando-se em conta as diferenças nacionais e culturais de comportamento sexual e assistência à saúde. O Brasil é um país de dimensão continental, com populações de diferentes níveis de desenvolvimento socioeconômico, o que justificaria as diferenças regionais encontradas (REDMOND et al., 2015; SAÚDE, 2016).

CONCLUSÕES

A presença da *C. trachomatis* na população HIV positiva foi maior do que a encontrada em outros estudos brasileiros, o que mostra a susceptibilidade e a vulnerabilidade destas pacientes, que apesar de assistidas pela unidade de saúde, ainda assim deixam passar doenças assintomáticas.

O rastreamento e a detecção das ISTs assintomáticas ou não, na população vivendo com ou sem HIV/AIDS e na população em geral, são de extrema importância para o controle da expansão da epidemia das ISTs e AIDS.

Deste modo, o estudo mostra um indicativo de que programas de rastreio dessas doenças, por métodos de exames não invasivos, tende a diminuir as possíveis complicações causadas pela *C. trachomatis* e outras ISTs, visando à prevenção do HIV. A atenção em saúde às ISTs/AIDS, precisa de ações preventivas que deveriam ser implementadas nos serviços de assistência especializada em HIV/AIDS.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Boletim Epidemiológico HIV/AIDS 2016. **Secretaria de Vigilância em Saúde**, Brasília, v. 48, n. 1, p. 4, 2017.

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

DEAN, Deborah. Chlamydia trachomatis today: treatment, detection, immunogenetics and the need for a greater global understanding of chlamydial disease pathogenesis. **Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)**, v. 45, n. Suppl B, p. 25, 2009.

KECK, C. et al. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. **Human Reproduction Update**, v. 4, n. 6, p. 891-903, 1998.

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

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

MACLEOD, John; SMITH, George Davey. Chlamydia screening can have high take-up rates if right methodology is used. **BMJ: British Medical Journal**, v. 319, n. 7203, p. 188, 1999.

MIRANDA, Angelica E. et al. Prevalence of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoea and associated factors among women living with Human Immunodeficiency Virus in Brazil: a multicenter study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. 402-407, 2017.

REDMOND, S. M.; ALEXANDER-KISSE, K.; WOODHALL, S. C. van den Broek IV, van Bergen J, Ward H, Uusküla A, Herrmann B, Andersen B, Götz HM, Sfetcu O, Low N. Genital Chlamydia prevalence in Europe and non-European high income countries: systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 10, n. 1, p. e0115753, 2015

SÉRGIO PIAZZETTA, Regina Celi Passagnolo. Prevalência da infecção por Chlamydia Trachomatis e Neisseria Gonorrhoea em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do Sul do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 33, n. 11, p. 328-33, 2011.