

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

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

ALZIRA RESENDE DO CARMO AQUINO

Porto Alegre, 2005.

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

**DETECÇÃO DE *Chlamydia trachomatis* EM AMOSTRAS DE URINA
MASCULINA POR REAÇÃO 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.

ALZIRA RESENDE DO CARMO AQUINO

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2005.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório 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.

Dedico este trabalho aos meus filhos Carlos Henrique e Diana, pela paciência, estímulo e amor.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Lúcia Rossetti, por ter me iniciado no mundo da biologia molecular, assim como me acolhido em seu laboratório.

À Dra. Marilene Henning Vainstein, pela sua orientação tranqüila, experiente e sensível, que me ajudou a transformar uma expectativa em realidade.

À Daniela Becker, pela sua paciência e amizade, me ensinado as técnicas moleculares, motivo do meu trabalho.

Aos estagiários: Livia, Naíla, Shana e Fernando pelo auxílio inestimável no laboratório, demonstrando competência, e interesse por novas técnicas.

À coordenação de Estudo de Prevalência e Frequências Relativas das DST no Brasil, na figura do Dr. Fabio Moherdau, que disponibilizou as amostras clínicas para a realização deste trabalho.

Às colegas que conheci no CDCT e LACEN, que foram muito solícitas durante todos meus experimentos entre elas posso citar Márcia, Beth, Camile, Patrícia, Vivian, Cíntia, Cláudia, Lia, Cris, Déa, Flúvia, Tatiana, Marilda, Linda, Ivete, Candice e Irina.

À Ludmila Baethgen por sua grande generosidade lendo e sugerindo correções ao trabalho, muito me sensibilizou.

Aos amigos do BIOTEC, foi um privilégio tê-los conhecido.

Aos colaboradores do Laboratório Unilab que souberam assumir responsabilidade extra durante minha ausência e ao Rafael por sua ajuda técnica.

Ao Dr. Geraldo Atílio De Carli por sua generosa colaboração e amizade.

À Dra. Carmem Pilla agradeço o estímulo e amizade.

Ao meu filho Carlos Henrique por pacientemente aulas de informática e ajuda na montagem das tabelas e figuras.

Ao Dr Mauro Ramos pelo incentivo e ao Dr Erno Harzheim pela inestimável colaboração com os dados estatísticos, o meu muito obrigado.

Ao meu órgão financiador CEARGS (Centro de Estudos de Aids/DST do Rio Grande do Sul e Center for Aids Prevention Studies, University of Califórnia – San Francisco / US Fogarty International Center: ICOHRTA Grant # 1D43TW05799).

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades	viii
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
1 Introdução.....	17
1.1 <i>Chlamydia trachomatis</i> - Ciclo de vida.....	19
1.2 Composição química e antigênica.....	21
1.3 Epidemiologia	24
1.4 Imunidade	26
1.5 Patogênese.....	27
1.6 Manifestações clínicas e tratamento	29
1.6.1 Tracoma ocular clássico	29
1.6.2 Linfogranuloma venéreo (LGV).....	29
1.6.3 Doenças óculo-genitais em adultos	30
1.6.3.1 Conjuntivite de Inclusão.....	31
1.6.3.2 Doenças urogenitais	31
1.6.4 Infecção perinatal.....	33
1.7 Fatores demográficos e risco para as infecções por <i>C. trachomatis</i>	34
1.8 Estratégia de prevenção.....	34
1.9 Métodos de diagnóstico laboratorial para <i>Chlamydia trachomatis</i>	36
1.9.1 Coleta e transporte de amostras clínicas.....	36
1.9.2 Isolamento em cultivo celular	38
1.9.3 Técnicas não culturais para detecção de antígeno	39
1.9.3.1 Exame citológico direto.....	39
1.9.3.2 Técnicas com anticorpos fluorescentes.....	40
1.9.3.3 Testes de enzima-imunoensaio (EIE)	40
1.9.3.4 Testes rápidos para detecção de antígeno.....	41
1.9.4 Técnica não cultural para detecção de anticorpos.....	42
1.9.5 Técnicas de biologia molecular	43
1.9.5.1 Hibridização com sondas de DNA e RNA.....	43
1.9.5.2 Amplificação de ácidos nucléicos.....	44
1.9.5.3 Performance dos diferentes testes para o diagnóstico de <i>Chlamydia trachomatis</i>	47
1.9.5.4 Performance dos NAAT para o diagnóstico de <i>Chlamydia</i> <i>trachomatis</i> em urina, envolvendo pelo menos um <i>kit</i> comercial aprovado pelo FDA	48
2 Justificativa.....	49
3 Objetivos	51
3.1 Objetivo Geral	51
3.2 Objetivos Específicos	51
4 Materiais e Métodos.....	52

4.1	Amostras clínicas e pacientes	52
4.1.1	Critérios de inclusão para homens com sintomas e ou sinais de DST.....	52
4.1.2	Critério de exclusão para homens com sintomas e ou sinais de DST.....	52
4.1.3	Critérios de inclusão para homens sem sinais e ou sintomas de DST.....	52
4.1.4	Critério de exclusão para homens sem sinal e ou sintomas de DST.....	53
4.2	Coleta, transporte e estoque das amostras clínicas.....	53
4.2.1	Seleção das amostras clínicas	53
4.3	Análise das amostras pelo Sistema Automatizado COBAS Amplicor	54
4.3.1	Preparação de reagente (pré-PCR)	54
4.3.2	Preparação da amostra (pré-PCR).....	55
4.3.3	Amplificação (pós-PCR)	55
4.3.4	Detecção (pós-PCR)	55
4.4	Protocolo <i>in house</i> para detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i>	56
4.4.1	Extração e purificação do DNA da amostra clínica.....	56
4.4.2	Reação de amplificação	57
4.4.3	Análise dos produtos amplificados	58
4.4.4	Hibridização dos produtos de PCR	59
4.5	Obtenção do controle positivo para a PCR	60
4.5.1	Extração do DNA de <i>Chlamydia trachomatis</i>	60
4.5.2	Clonagem do fragmento de 201 pb de <i>Chlamydia trachomatis</i>	60
4.6	Determinação da especificidade dos <i>primers</i>	61
4.6.1	Escolha dos microrganismos para o teste de especificidade.....	61
4.6.2	Quantificação das leveduras e bactérias cultiváveis em urina.....	61
4.6.3	Quantificação de <i>Trichomonas vaginalis</i>	62
4.6.4	HPV e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	62
4.7	Estudo do fragmento amplificado	62
4.7.1	Clivagem enzimática do Produto Amplificado.....	62
4.7.2	Seqüenciamento do produto amplificado	63
4.8	Determinação do limite de detecção analítica da PCR <i>in house</i>	63
4.9	Teste de inibição da PCR.....	64
4.9.1	Teste de contaminação com o DNA clamidial (<i>spiked</i>)	64
4.9.2	Teste de inibição com um controle interno da reação	64
4.10	Análise estatística	65
5	Resultados	66
5.1	Adequação da temperatura de anelamento para o protocolo <i>in house</i>	66
5.2	Determinação da especificidade dos <i>primers</i>	68
5.3	Confirmação da seqüência amplificada	69
5.3.1	Clivagem enzimática do produto amplificado.....	69
5.3.2	Seqüenciamento do produto amplificado	70
5.4	Determinação do limite de detecção do teste	71
5.5	Análise das amostras clínicas	72

5.5.1	Análise das amostras positivas.....	73
5.5.2	Análise das amostras clínicas negativas	76
5.5.3	Teste de inibição da PCR <i>in house</i>	77
5.5.4	Análise estatística	80
5.5.4.1	Expressão gráfica da relação entre sensibilidade e especificidade	
	82	
6	Discussão	89
7	Conclusões.....	99
8	Perspectivas	102
9	Referências Bibliográficas	103
10	Anexos	117
10.1	Soluções e Tampões.....	118
10.2	Manuscrito.....	120

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Unidades

ATCC	“American Type Culture Collection”
ATP	trifosfato de adenosina
CADD	“Chlamydia protein associating with death domains”
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
CE	corpo elementar
CI	controle interno
CP	corpo persistente
CR	corpo reticular
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
DIP	doença inflamatória pélvica
dL	decilitro
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNTP	desoxinucleosídeo trifosfato
DST	doença sexualmente transmissível
EDTA	ácido etileno-diamino-tetracético; sal dissódico
FDA	“Food and Drug Administration”
fg	fentogramas
°C	graus Celsius
h	hora
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	antígeno leucocitário humano
HPV	Papilomavirus Humano
HSP	“heat shock protein”, ou proteína de choque térmico
IFD	imunofluorescência direta
IFN- γ	interferon gama
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
kb	quilobase

kDa	quilodalton
LGV	linfgranuloma venéreo
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
mg	miligrama
MIF	microimunofluorescência
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
MOMP	“Major outer membrane protein” ou principal proteína da membrana
NAAT	teste de amplificação de ácidos nucleicos
ng	nanograma
nm	nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	“open reading frame” ou fase de leitura aberta
pb	pares de base
PCR	“Polymerase Chain Reaction” ou Reação em Cadeia da Polimerase
pg	picograma
pmol	picomol
POC	“Point of care tests” ou testes rápidos
RFC	reação de fixação do complemento
RFLP	polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
RNA	ácido ribonucléico
rRNA	RNA ribossomal
ROC	“Receiver Operator Characteristic Curve”
rpm	rotações por minuto
s	segundos
TE	tris+EDTA

TEB	tris borato – EDTA
TMB	tetrametilbenzidina
TNF	fator de necrose tumoral
Tris	tris (hidroxi-metil) aminometano
U	Unidade (atividade enzimática)
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFI	Unidade Formadora de Inclusão
UNG	Uracil-N-glicosilase
USPSTF	Força tarefa do serviço de prevenção dos Estados Unidos
UV	radiação ultravioleta
V	Volts
W	Watts
μL	microlitro
μm	micrometros

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida bifásico e persistência da <i>C. trachomatis</i>.....	21
Figura 2. Dados do CDC de incidência de <i>C. trachomatis</i> nos EUA.....	24
Figura 3. Padrões de transmissão da <i>C. trachomatis</i> sorotipo D a K.....	30
Figura 4. Cultura de <i>Chlamydia trachomatis</i> corada com anticorpos fluorescentes.....	38
Figura 5. Teste da temperatura de anelamento a 52°C, 54°C e 56°C.....	67
Figura 6. Teste da temperatura de anelamento a 58°C e 60°C.....	67
Figura 7. Teste de especificidade dos <i>primers</i> CTP1 e CTP2.....	69
Figura 8. Análise eletroforética do produto de PCR após clivagem com EcoRV.....	70
Figura 9. Alinhamento da seqüência de 201 pb.....	71
Figura 10. Teste de sensibilidade analítica da PCR.....	72
Figura 11. Amostras de urina positivas para <i>C. trachomatis</i>.....	74
Figura 12. Amostras de urina positivas para <i>C. trachomatis</i>.....	75
Figura 13. Amostras de urina negativas para <i>C. trachomatis</i>.....	76
Figura 14. Teste de inibição da PCR <i>in house</i>.....	79
Figura 15. Acurácia da PCR <i>in house</i> após hibridização.....	83
Figura 16. Acurácia da PCR <i>in house</i> após nova extração.....	84

Lista de Tabelas

Tabela 1. Doenças humanas causadas por <i>Chlamydia trachomatis</i>.....	23
Tabela 2. Triagem para prevenção da infecção clamidial.....	35
Tabela 3. Performance dos testes diagnósticos para <i>Chlamydia trachomatis</i>.....	47
Tabela 4. Sensibilidade e especificidade de NAAT para detecção de <i>C. trachomatis</i>.....	48
Tabela 5. Amostras clínicas utilizadas no experimento.....	73
Tabela 6. Amostras clínicas positivas para <i>C. trachomatis</i> pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR <i>in house</i>.....	75
Tabela 7. Amostras clínicas negativas para <i>C. trachomatis</i> pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR <i>in house</i>.....	77
Tabela 8. Cálculo estatístico dos resultados obtidos pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR <i>in house</i> com detecção em gel de agarose.....	80
Tabela 9. Cálculo estatístico dos resultados obtidos pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR <i>in house</i> com detecção após hibridização.....	81
Tabela 10. Cálculo estatístico dos resultados obtidos pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR <i>in house</i> após repetição das amostras que apresentaram resultados divergentes.....	82
Tabela 11. Outros microrganismos associados à <i>C. trachomatis</i>.....	85
Tabela 12. Análises individuais das amostras de urina do estudo.....	86

Resumo

Infecções por *Chlamydia trachomatis* estão entre as mais frequentes doenças sexualmente transmissíveis (DST) em todo o mundo, apresentando grande importância epidemiológica. A identificação deste patógeno pode ser difícil e um método de detecção baseado na amplificação de ácidos nucleicos é altamente desejável, por sua acurácia e rapidez. O presente estudo avaliou a acurácia, sensibilidade e especificidade de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) *in house* em amostras de urina de homens com e sem sintomas de DST comparados a um teste comercial, o COBAS Amplicor CT/NG (Roche, Suíça). Foram utilizados *primers* específicos para amplificar um segmento do plasmídeo críptico de *C. trachomatis* gerando um fragmento de 201 pb, cuja seqüência foi confirmada por clivagem enzimática e seqüenciamento automático. A especificidade analítica dos *primers* foi confirmada frente ao DNA de diferentes microrganismos patogênicos e não patogênicos da microbiota urogenital masculina. A detecção limite do DNA clamidial pela PCR *in house* após hibridização (Southern blot), foi de 1 pg.

O COBAS Amplicor CT/NG foi considerado o teste de referência por ser automatizado e conter um programa de controle interno da reação para identificar inibição da DNA polimerase. Entre as 37 amostras testadas positivas para *C. trachomatis* pelo COBAS Amplicor, 33 foram confirmadas positivas pela PCR *in house*. Foram detectados inibidores da reação nas 4 amostras que apresentaram resultados falso-negativos, utilizando-se a técnica de contaminação da reação com o DNA clamidial (spiked) e um controle interno da reação com *primers* que amplificam a β -globina do DNA humano. Após congelamento e descongelamento para eliminar prováveis substâncias inibidoras lábeis, as 4 amostras foram re-testadas, resultando na positividade de mais 2 amostras, completando 35 amostras positivas pela PCR *in house*. Entre as 74 amostras testadas negativas para *C. trachomatis* pelo COBAS Amplicor, 72 foram confirmadas negativas pela PCR *in house*. Das 2 amostras prováveis falso-positivas, apenas 1 permaneceu positiva, após re-teste. Dos 111 pacientes analisados, 108 apresentaram resultados idênticos nos dois testes, o

equivalente a uma acurácia = 97,3%, sensibilidade = 94,6% e especificidade = 98,6%. A alta sensibilidade e especificidade apresentada pela PCR *in house*, demonstra a possibilidade de triar e diagnosticar *C. trachomatis* em urina de homens, importante reservatório da infecção clamidial para as mulheres.

Abstract

Chlamydia trachomatis infections are among the most common sexually transmitted diseases and of great epidemiological importance world-wide. Identification of this pathogen can be difficult, and it is highly desirable to have a rapid and accurate nucleic acid amplification based detection method. The present study was designed to evaluate the accuracy, sensitivity and specificity of an in house plasmid-based polymerase chain reaction (PCR) and hybridization on first void urine specimens from symptomatic and asymptomatic men, compared with a commercial test the PCR COBAS Amplicor CT/NG (Roche, Switzerland), for detection of *C. trachomatis* (CT). Specific primers for the cryptic plasmid of *C. trachomatis* were designed to amplify a 201 bp fragment confirmed by enzymatic cleavage and automatic sequencing. The analytic specificity was determined by submitting to the intended protocol, the DNA of normal and pathogenic urogenital microbiota, the specific primers annealing was confirmed. The detection limit of the PCR and the Southern blot hybridization, was measured in 1 pg of chlamydial DNA. The COBAS Amplicor CT/NG was considered the reference test, it contains an internal control (IC) programme to identify DNA polymerase inhibition.

Among 37 positive specimens tested by COBAS Amplicor, 33 were confirmed positive by in house PCR and inhibitors of PCR were demonstrated in the 4 possibly false-negative samples performing DNA chlamydial spiking experiments and using a positive internal control of human β -globin DNA. The specimens were freeze-thawed and re-tested to remove labile inhibitors, but 2 samples remained negative. Among 74 negative specimens by COBAS Amplicor, 72 were confirmed negative by in house PCR. The 2 probably false-positive samples were re-tested and just one remained positive. The final results of the two tests were identical for 108 of the 111 patients, accuracy = 97,3% ; sensitivity = 94,6% and specificity = 98,6%. This study shows that the in house plasmid-based PCR is feasible for detection of *Chlamydia trachomatis* in male urine specimens. This test presented high accuracy, sensitivity

and specificity, offering great potential for the screening of men, an important reservoir of infection chlamydial for women.

1 Introdução

Clamídias são bactérias parasitas intracelulares obrigatórias de células eucarióticas, imóveis, amplamente distribuídas no reino animal. Apresentam parede celular semelhante à das bactérias gram-negativas e um ciclo de divisão celular bifásico característico, que será discutido no item 1.1 (Schachter & Stamm, 1999; Francisco, 2001). São patógenos capazes de infectar animais de sangue quente e frio, e vários tipos de células, desde protistas do solo, como as *Acanthamoebas*, até as células microgliais do cérebro. Replicam-se no citoplasma da célula hospedeira no interior de um vacúolo endossomal que ao microscópio se apresenta como uma inclusão intracelular (Mahony *et al.*, 2003). A inclusão clamidial é isolada da rota endocítica pela inibição da fusão lisossomal, por um mecanismo ainda não definido, mas é fusogênica com vesículas exocíticas originárias do complexo de Golgi. A biogênese deste compartimento depende de uma combinação de funções do hospedeiro e parasita, onde o microrganismo, durante seu ciclo de desenvolvimento, se comunica, manipula e modula a transcrição de alguns genes da célula hospedeira (Fields & Hackstadt, 2002; Alberts *et al.* 2004; Stamm *et al.*, 2005).

Taxonômicamente, estes microrganismos foram classificados com base em suas propriedades fenotípicas, na ordem *Chlamydiales*, família *Chlamydiaceae*, com um único gênero *Chlamydia* e 4 espécies conhecidas: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia psittaci* e *Chlamydia pecorum*, todas associadas à doenças humana, exceto a *C. pecorum* (Schachter & Stamm, 1999; Francisco, 2001; Stamm *et al.*, 2005).

Everett, Bush e Anderson (1999), propuseram uma nova classificação com base na análise da seqüência dos genes que codificam para 16S rRNA e 23S rRNA, dividindo a ordem *Chlamydiales* em 4 famílias: 1- *Chlamydiaceae* contendo 2 gêneros, *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. muridarum* e *C. suis*) e *Chlamydophila* (*C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae* e *C. felis*); 2- *Simkaniaceae*, que inclui *Simkania negevensis*; 3- *Parachlamydiaceae*, que inclui *Parachlamydia acanthamoeba*; 4- *Waddliaceae* que inclui *Waddlia chondrophila*.

Ambas as classificações estão atualmente em uso na literatura (Corsaro *et al.*, 2003; Mahony *et al.*, 2003; Stamm *et al.*, 2005).

De acordo com a nova classificação, as espécies *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*, *C. abortus*, e *C. felis* são patogênicas para humanos, enquanto que as espécies *P. acanthamoeba* e *S. negevensis* são consideradas patógenos humanos emergentes, associados à infecções respiratórias (Corsaro *et al.*, 2003).

Chlamydia pneumoniae é representada por uma única linhagem, com apenas 10% ou menos de homologia com a *C. trachomatis* e a *C. psittaci*. É um patógeno comum em todo o mundo, sendo considerada a principal causa de pneumonia comunitária. Nos pulmões pode infectar macrófagos, que ao cair na corrente circulatória transporta o microrganismo para sítios distantes; incluindo o endotélio vascular e células do músculo liso, fornecendo indícios de correlação com aterosclerose e doença coronariana arterial. O DNA de *C. pneumoniae* foi recentemente detectado em líquido de pacientes com esclerose múltipla e em tecido cerebral *postmortem* de pacientes com a doença de Alzheimer (Mahony *et al.*, 2003; Stamm *et al.*, 2005).

Chlamydia psittaci, distribui-se em 4 grupos de linhagens geneticamente distintas, apresentando uma homologia que varia de 5% a 20% com a *C. trachomatis*. Primariamente infecta muitas espécies de aves e mamíferos causando psitacose, ornitose, pneumonite felina e aborto bovino. Humanos são infectados secundariamente desenvolvendo pneumonia ou infecção sistêmica, inclusive endocardite (Mahony *et al.*, 2003; Stamm *et al.*, 2005).

Chlamydia trachomatis, tem sido a espécie mais extensivamente estudada, as cepas humanas apresentam quase 100% de homologia entre si, e em torno de 30% de homologia com o biotipo de camundongo, que não causa doença em humanos e segundo alguns autores, deveria ser classificado como uma nova espécie (Stamm *et al.*, 2005). O acúmulo de glicogênio na inclusão é considerado uma característica fenotípica, que diferencia a *C. trachomatis* de outras espécies e o microrganismo parece ser o responsável por grande parte da produção deste composto (Miyashita *et*

al., 2001). *C. trachomatis* causa o tracoma, linfogranuloma venéreo (LGV), doenças do trato genital e conjuntivite de inclusão (Black, 1997).

1.1 *Chlamydia trachomatis* - Ciclo de vida

O ciclo de divisão celular da *C. trachomatis* se completa, *in vitro*, de 36 a 72 horas (Warford *et al.*, 1999). A bactéria em sua forma infectante metabolicamente inerte é conhecida como o corpo elementar (CE), com cerca de 350 nm de diâmetro, penetra na célula epitelial suscetível por fagocitose, pinocitose ou endocitose parasito induzida, mediada por receptores via cavidade revestida por clatrina (Stamm *et al.* 2005). Os receptores celulares ainda são desconhecidos, porém a proteína dissulfeto isomerase do complexo receptor de estrogênio de células endometriais humanas, na presença do polissacarídeo sulfatado (*heparan sulfate*) apresentado pela *C. trachomatis* sorotipo E, atua como mediador na adesão e invasão celular (Davis *et al.*, 2002). Segundo Stephens e colaboradores (2000), apenas moléculas de *heparan sulfate* apresentadas na superfície bacteriana, seriam suficientes para promover a ligação e a invasão da célula. Também foi demonstrado que moléculas de *heparan sulfate* do corpo elementar se ligam a fibronectina da célula alvo, fazendo uma ponte molecular que facilita a penetração da bactéria na célula hospedeira (Kleba *et al.*, 2002).

A ação lisossomal celular é inibida, permitindo ao corpo elementar residir em uma vesícula denominada inclusão, envolta por uma membrana derivada da membrana plasmática da célula parasitada. O CE sofre um processo de redução das ligações entre as proteínas da membrana e a ativação de uma adenosina trifosfatase, que degrada o ATP da célula hospedeira, ganhando energia para se reorganizar em uma forma replicativa maior, o corpo reticular (CR). O CR é uma estrutura menos condensada, de 800 a 1000 nm de diâmetro, que inicia a síntese de RNA, DNA e novas proteínas (Mahony *et al.*, 2003; Stamm *et al.* 2005).

Os CRs são osmoticamente instáveis e incapazes de infectar novas células, porém sofrem divisão por fissão binária produzindo uma grande inclusão

citoplasmática contendo de 100 a 1000 novos corpos elementares (Warford *et al.* 1999; Stamm *et al.* 2005). Os sinais que controlam este processo e as proteínas bacterianas necessárias para a transformação morfológica são pouco conhecidos, mas envolvem em parte, a oxidação de proteínas da membrana externa clamidial, ricas em cisteína, para formar ligações dissulfeto, gerando corpos elementares semelhantes a esporos, rígidos e osmoticamente estáveis, adaptados para a sobrevivência extracelular (Mahony *et al.*, 2003; Stamm *et al.* 2005).

O fim do ciclo culmina com a liberação dos corpos elementares, permitindo a infecção de novas células. A liberação pode ocorrer por um processo semelhante a exocitose, extrusão da inclusão ou por lise celular. (Stamm *et al.* 2005) (Figura 1). A proteína clamidial CADD (“*Chlamydia* protein associating with death domains”), conduz a célula parasitada a apoptose e a interagir com receptores da família TNF (fator de necrose tumoral) do hospedeiro, podendo ser um dos mecanismos utilizados pela bactéria para se liberar e infectar novas células (Stenner-Liewen *et al.*, 2002; www.chlamydiae.com/docs/biology/biol_apop.asp).

Em condições ambientais adversas, tais como exaustão de nutrientes, concentração sub-ótima de antibióticos e presença de interferon gama (IFN- γ) as clamídias assumem a forma de corpo persistente (CP) com um padrão de expressão gênica alterado, que contribui para sua sobrevivência intracelular, servindo de reservatório para novas infecções (Mahony *et al.*, 2003; Morrison, 2003). Novas categorias de genes envolvidos na persistência clamidial estão sendo analisados pela tecnologia dos Microarranjos, fornecendo amplo transcriptoma para o estudo da persistência da *C. trachomatis* expostas ao IFN- γ (Hogan *et al.*, 2004).

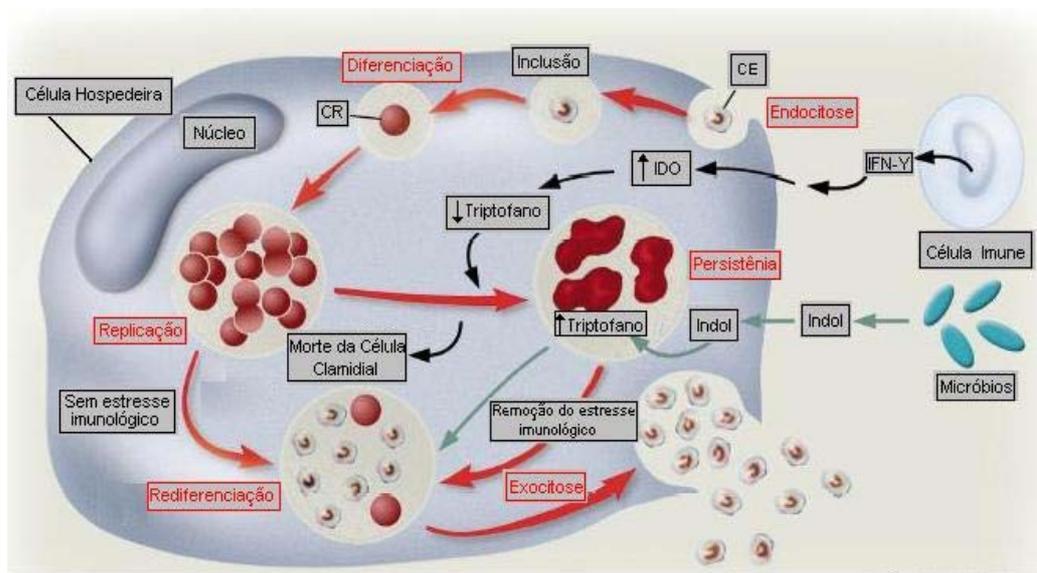


Figura 1. Ciclo de vida bifásico e persistência de *Chlamydia trachomatis* (Morrison, 2003).

1.2 Composição química e antigênica

O genoma da *C. trachomatis* é formado por um cromossomo circular, com 1.042.519 pb (58,7% de A-T) e um plasmídio com 7493 pb (GenBank AE001273). O genoma clamidial codifica aproximadamente 875 proteínas, das quais 70 são exclusivas da espécie *C. trachomatis* (Stephens *et al.*, 1998; www.chlamydia.berkeley.edu:4231/index.html). O genoma da clamídia tem uma massa molecular de apenas 660×10^6 daltons, sendo menor que a de qualquer procarioto, exceto do *Mycoplasma* spp. Até o momento foram seqüenciados 7 genomas completos, e a comparação entre eles indica pouca oportunidade para troca genética horizontal entre as clamídias e outros microrganismos, mas pode ocorrer troca de genes via plasmídio ou bacteriófagos (Stamm *et al.*, 2005). O primeiro genoma clamidial seqüenciado foi de *C. trachomatis* sorotipo D, sendo o genoma completo do sorotipo L2 também já é conhecido e o do sotipo B foi parcialmente seqüenciado. Os genomas seqüenciados favorecem avanços no entendimento da biologia celular, através do estudo de padrões de expressão de componentes-chave

em nível de proteínas, onde 35% do proteoma predito para *C. trachomatis* já foi verificado experimentalmente (www.chlamidiae.com/docs/biology/genome; Skipp *et al.*, 2005; Stamm *et al.*, 2005).

Todos os plasmídios de isolados de *C. trachomatis* são extremamente conservados, com menos de 1% de variação na seqüência de nucleotídeos. Apresentam 8 ORFs (fases de leitura aberta) intercaladas por 4 seqüências curtas não codificantes de 22 pares de base em *tandem* (Thomas *et al.*, 1997). Isolados clínicos de *C. trachomatis* que não apresentam plasmídios, embora sejam 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, demonstrando que este não contribui na transferência de resistência. Por outro lado, estas mesmas linhagens 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 plasmídio 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. A grande importância do plasmídio no diagnóstico da infecção por *C. trachomatis* baseado no DNA, é fornecer múltiplos alvos, pois se apresentam de 7 a 10 cópias e também podem ser usados para o desenvolvimento de novos métodos baseados na tecnologia de Microarranjos de DNA (www.chlamidiae.com/docs/biology/genome_-plasmid.asp).

Chlamidiae contém antígenos comuns e espécie-específicos que desempenham um papel na patogênese e no diagnóstico da infecção (Mahony *et al.*, 2003). O antígeno lipopolissacáride (LPS) clamidial é grupo-específico, e os antígenos protéicos são espécies-específicos e imunotipo-específicos, sendo a MOMP (*major outer membrane protein*), codificada pelo gene *ompA*, a proteína antigênicamente considerada a mais importante por apresentar antígenos que são utilizados para a sorotipagem das cepas clamidiais. A proteína de membrana rica em cisteína de 60-kDa (OmcB), é também um antígeno dominante espécie-específico.

Proteínas da membrana como a proteína OmcB, a proteína de choque térmico de 60-kDa (HSP60), e a MOMP já foram caracterizadas por apresentarem também epitopos gênero reativos (Seadi, 2002; Mahony *et al.*, 2003; Stamm *et al.* 2005).

As linhagens de *C. trachomatis* são divididas em pelo menos 18 diferentes sorotipos baseados na reatividade imunológica da MOMP. Adicionalmente, os sorotipos de *C. trachomatis* são classificados em dois grupos, o biotipo tracoma e biotipo linfogranuloma venéreo, baseados nas diferenças entre as doenças que produzem e nas características do crescimento em cultura de células. O biotipo tracoma inclui sorotipos que causam tracoma ocular (A, B, Ba, C) e sorotipos que causam doença urogenital (D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K) enquanto que o biotipo linfogranuloma venéreo inclui os sorotipos (L1, L2, L2a, e L3) (Stothard *et al.*, 2003). A relação das doenças humanas causadas por *C. trachomatis* e seus sorotipos estão apresentados na Tabela 1.

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

SOROTIPO	SEXO	DOENÇAS
A,B,Ba,C D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K	Ambos	Tracoma, conjuntivite, queratite
	Feminino	Uretrite, cervicite, endometrite, salpingite e peri-hepatite
	Masculino	Uretrite, prostatite, epididimite
	Ambos	Conjuntivite, proctite, Síndrome de Reiter
	Neonatos	<i>Oftalmia neonatorum</i> , pneumonia.
L1,L2,L2a,L3	Ambos	Linfogranuloma venéreo

Fonte: Francisco, 2001; Stothard *et al.*, 2003

1.3 Epidemiologia

C. trachomatis é conhecida como a mais comum das bactérias causadoras de doença sexualmente transmissível (DST). Estima-se que cerca de 4 milhões de novas infecções clamidiais ocorram por ano nos Estados Unidos, com custos excedendo 2,4 bilhões de dólares, sendo também críticos os custos intangíveis como o dano psicológico e emocional causado pela infertilidade e gravidez ectópica (Black, 1997; Warford *et al.*, 1999; CDC MMWR, 2002). Desde 1988 o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), mantém programas de *triagem* para infecções por *C. trachomatis* em mulheres. Se o aumento do número de casos reportados ano após ano reflete, por um lado, a expansão dos programas de triagem e o desenvolvimento e uso de testes diagnósticos mais sensíveis naquele país, verifica-se por outro lado, que as taxas de infecção ainda permanecem altas (Figura 2) (<http://www.cdc.gov/sdt/Chlamydia2002/>).

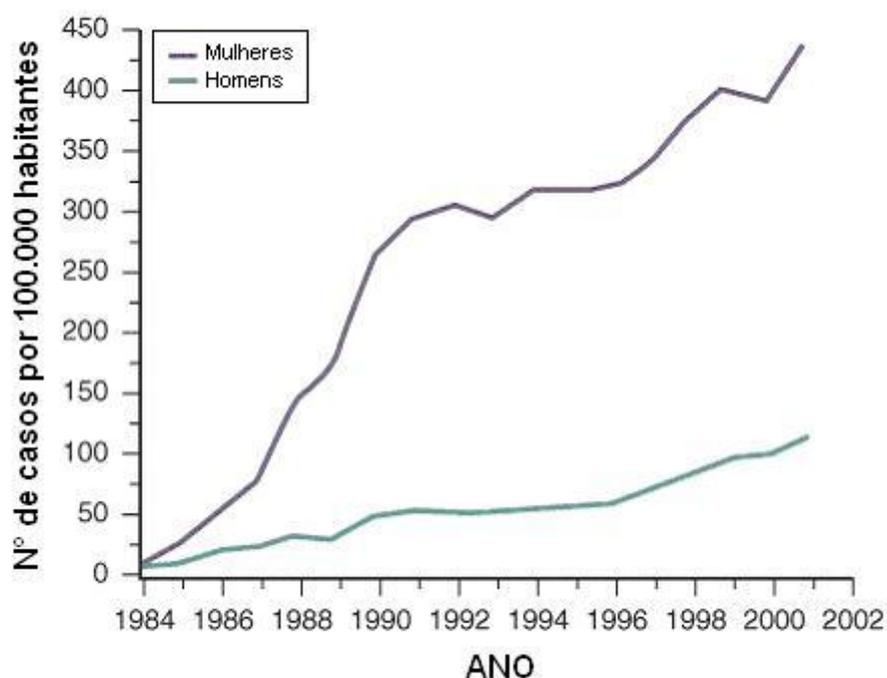


Figura 2. Incidência de *C. trachomatis* nos EUA
(<http://www.cdc.gov/sdt/Chlamydia2002/>).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou 91,98 milhões de novos casos de infecção por clamídia, em 1999. Para a América Latina e Caribe a estimativa foi de 9,31 milhões no mesmo ano (www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/003.htm).

Estima-se também, que 500 milhões de pessoas no mundo estão afetadas pelo tracoma ocular, e que de 7 a 9 milhões delas, desenvolverão cegueira. O tracoma ocular é considerado a causa mais comum de cegueira prevenível nos países em desenvolvimento (Warford *et al.*, 1999; Stamm *et al.*, 2005).

No Brasil, a infecção clamidial não é uma doença de notificação compulsória. Poucos estudos de prevalência vem sendo conduzidos isoladamente em populações específicas. Na cidade de Porto Alegre (RS) mulheres de uma vila popular apresentaram prevalência de 0,59%, enquanto homens de uma clínica de DST apresentaram uma prevalência de 41,9% (Ramos *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2003). Outro estudo realizado em Vitória (ES), constatou uma prevalência de 12,2% em mulheres adolescentes sexualmente ativas (Miranda *et al.*, 2004), e a prevalência de 20,7% foi detectada na cidade de Manaus (AM) em mulheres atendidas em serviços especializados em DST (Santos *et al.*, 2003).

Estudos relatam taxas de prevalência na faixa de 5% a 20% entre mulheres que freqüentam clínicas de planejamento familiar, de 20% a 40% entre mulheres e garotas adolescentes, sexualmente ativas, que freqüentam clínicas de DST e em 25% de todas as mulheres de clínicas ginecológicas. Aproximadamente 8% das mulheres jovens atendidas em maternidades, sem sintomas de infecção urogenital, são portadoras de *C. trachomatis* (Francisco, 2001).

A infecção em neonatos ocorre como resultado da exposição perinatal e estima-se que 65% dos bebês nascidos de mães contaminadas se infectam durante o parto vaginal.

Em homens assintomáticos, a prevalência de *C. trachomatis* varia de 4% a 10% e de 15% a 20% em homens atendidos em clínicas de DST (Blake, 1997).

Infecções por *C. trachomatis* no trato genital têm sido associadas com o aumento da taxa de transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV). A

inflamação induzida por *C. trachomatis* resulta em um maior recrutamento de linfócitos CD4 no trato genital aumentando o número de células alvo para o HIV (Mahony *et al.*, 2003). O tratamento das infecções clamidiais poderia então, diminuir a disseminação do vírus em alguns grupos (Black, 1997).

A infecção prévia por *C. trachomatis* em mulheres portadoras do Papilomavirus humano oncogênico (HPV), favorece a persistência viral, considerada fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical (Silins *et al.*, 2005).

O grande desafio do controle da infecção clamidial é que 70% a 80% das mulheres e mais de 50% dos homens infectados não apresentam nenhum sintoma. Isto resulta em um grande reservatório de indivíduos desconhecidos, infectados, que são capazes de transmitir a infecção aos seus parceiros sexuais (Blake, 1997).

1.4 Imunidade

A imunidade protetora adquirida é apenas parcial e tipo-específica, havendo com freqüência infecções recorrentes. Em mulheres a re-infecção aumenta o risco de seqüelas, tais como gravidez ectópica ou infertilidade (Black, 1997). Adolescentes de alto risco apresentam pré-disponibilidade para a recorrência clamidial quando existem variantes nos genes que codificam citocinas e antígeno leucocitário humano (HLA) (Wang *et al.*, 2005).

Alguns dados sugerem que a infecção no trato uretral masculino, confere uma imunidade parcial contra a re-infecção por um período de aproximadamente 6 meses (Black, 1999; Stamm *et al.*, 2005).

Anticorpos direcionados aos epitopos da MOMP são neutralizadores, podendo diminuir as chances de infecção clamidial e a IgA secretora está inversamente relacionada com o número de organismos encontrados no endocérvice de mulheres infectadas. Células T CD4⁺ e células B são os principais mediadores da memória imunológica da infecção clamidial, no entanto as células T CD8⁺ podem induzir a produção do INF γ , que exerce atividade citotóxica na célula parasitada.

Ainda não existe um modelo de vacinação prevista, pois a vacina contra o tracoma além de ser sorotipo específica confere imunidade por apenas um ou dois anos (Stamm *et al.*, 2005).

1.5 Patogênese

A resposta primária à infecção por *C. trachomatis* parece ser por leucócitos polimorfonucleares, estimulados pela interleucina-8 e outras citocinas pró-inflamatórias produzidas pela célula hospedeira. O principal antígeno clamidial capaz de induzir a produção de citocinas é o LPS. A infiltração neutrofílica tecidual inicial, é acompanhada por linfócitos, macrófagos, plasmócitos e eosinófilos. Em infecções oculares e genitais plasmócitos são encontrados em grande número, porém em pneumonia infantil, eosinófilos e neutrófilos são predominantes (Stamm *et al.*, 2005).

A produção do interferon gama (INF- γ) pela célula parasitada, pode inibir a replicação clamidial, favorecendo a persistência bacteriana (Shaw *et al.*, 2000; Morrison, 2003). A infecção persistente pode ser também, um sub-produto da inibição da apoptose, conferindo impacto significativo na patogênese da doença (Dean & Powers, 2001).

As seqüelas mais severas da infecção por *C. trachomatis* como a perda da visão no tracoma, gravidez ectópica ou infertilidade na doença inflamatória pélvica, são causadas por fibrose e cicatrizes de reparo do tecido danificado através da inflamação induzida pelo microrganismo. Os maiores determinantes para a severidade das doenças são: 1- fatores sócio-ambientais, tendo influência o número de organismos infectantes e a probabilidade de re-infecções; 2- a magnitude da resposta inflamatória inicial (determinadas em parte pelas citocinas pró-inflamatórias); 3- fatores genéticos do hospedeiro que regulam a resposta imune, associados a mecanismos de reparo; 4- a sensibilidade da cepa infectante ao interferon gama e outras moléculas potencialmente protetoras; 5- o potencial para dano auto-imune ao hospedeiro, aumentado pela cHSP60 ou outros antígenos

clamidiais que são similares ou mimetizam componentes da célula; 6- a capacidade da clamídia ser seqüestrada para sítios imunologicamente protegidos ou inacessíveis, como articulações e artérias coronárias; 7- a capacidade da clamídia induzir ou prevenir a apoptose (http://www.chlamydiae.com/docs/biology/impathol_intro.asp).

Tem sido proposto que *C. trachomatis* apresenta atividade citotóxica que contribui para sua patologia, por apresentar genes que codificam proteínas com significativa homologia as citotoxinas clostridiais, porém nenhuma toxina foi ainda identificada (Belland *et al.*, 2001).

Sugere-se que a patogênese da doença por *C. trachomatis* em parte seja auto-imune tendo como antígeno sensibilizante a proteína clamidial cHSP60 (*heat-shock protein* de 60 KDa), que apresenta considerável homologia na seqüência de aminoácidos com proteínas análogas de outras espécies, e com a humana. A presença de anticorpos séricos que reagem com a cHSP60 está associado com peri-hepatite, gravidez ectópica e infertilidade em mulheres (Mardh, 2004; Stamm *et al.*, 2005).

O biotipo LGV, de *C. trachomatis*, infecta células epiteliais da membrana mucosa do trato genital ou retal e as bactérias são drenadas através dos vasos linfáticos para os linfonodos, multiplicando-se em fagócitos mononucleares. A característica histopatológica é a formação de granuloma e abscessos que podem necrosar ou supurar (Stamm *et al.*, 2005).

O biotipo tracoma infecta as células epiteliais escamo-colunares da endocérvice e do trato genital superior das mulheres, assim como a conjuntiva, uretra, e reto tanto em homens quanto em mulheres. No homem, o epidídimo e a próstata podem ser infectados, assim como as células epiteliais colunares do trato respiratório das crianças (Stamm *et al.*, 2005).

Em doença ocular com o biotipo tracoma aparecem folículos linfóides no início da inflamação aguda que se tornam necróticos com o progresso da doença. Infecções oculares iniciais resolvem-se com pouco ou nenhum dano tecidual. Contudo, infecções recorrentes produzem uma resposta inflamatória intensa, com cicatrizes e danos teciduais (Stamm *et al.*, 2005).

1.6 Manifestações clínicas e tratamento

Segundo Stamm *et al.*, (2005), as infecções por *C. trachomatis* podem ser divididas em 4 categorias clínicas: 1. tracoma ocular clássico; 2. linfogranuloma venéreo; 3. doenças óculo-genitais em adultos; 4. infecção perinatal.

1.6.1 Tracoma ocular clássico

Em seu estágio inicial o tracoma se apresenta como uma conjuntivite folicular crônica com hipertrofia papilar e infiltrado inflamatório; com o progresso da doença surgem cicatrizes na conjuntiva e opacidade da córnea, resultando em cegueira. Em regiões endêmicas a primeira infecção costuma ocorrer bem cedo na infância, e a doença ativa pode persistir por muitos anos. A higiene é fundamental no controle da doença, incluindo limpeza facial e combate às moscas domésticas. A azitromicina tem sido usada em programas de tratamento populacional, que também envolve cirurgia de pálpebras para evitar a cegueira. A eritromicina é uma outra opção, porém a doxiciclina é contra indicada para o tratamento de crianças pequenas (Stamm *et al.*, 2005).

1.6.2 Linfogranuloma venéreo (LGV)

O LGV é uma doença sistêmica causada pelo pelos sorotipos L1, L2, L2a e L3 de *C. trachomatis*, altamente prevalentes em partes da África, Ásia e América do Sul (Black, 1999). O sintoma primário é caracterizado por úlcera ou vesícula genital indolor, com cura espontânea. O estágio secundário apresenta linfadenopatia que ocorre dias após a lesão primária com manifestações sistêmicas incluindo febre, mal estar, arrepios, anorexia, mialgia e artralgia. Infecções não tratadas podem conduzir a complicações tardias incluindo ulceração e hipertrofia da genitália, artrite, proctite, proctocolite e formação de fístulas envolvendo o reto, bexiga, vagina ou vulva (Black, 1997; Warford *et al.*, 1999). O tratamento pode ser feito com tetraciclina,

doxiciclinas, minociclinas, cloranfenicol, eritromicina e rifampicina (Stamm *et al.*, 2005).

1.6.3 Doenças óculo-genitais em adultos

C. trachomatis sorotipos de D a K produzem uma ampla variedade de infecções óculo-genitais (Figura 3) (Stamm *et al.*, 2005).

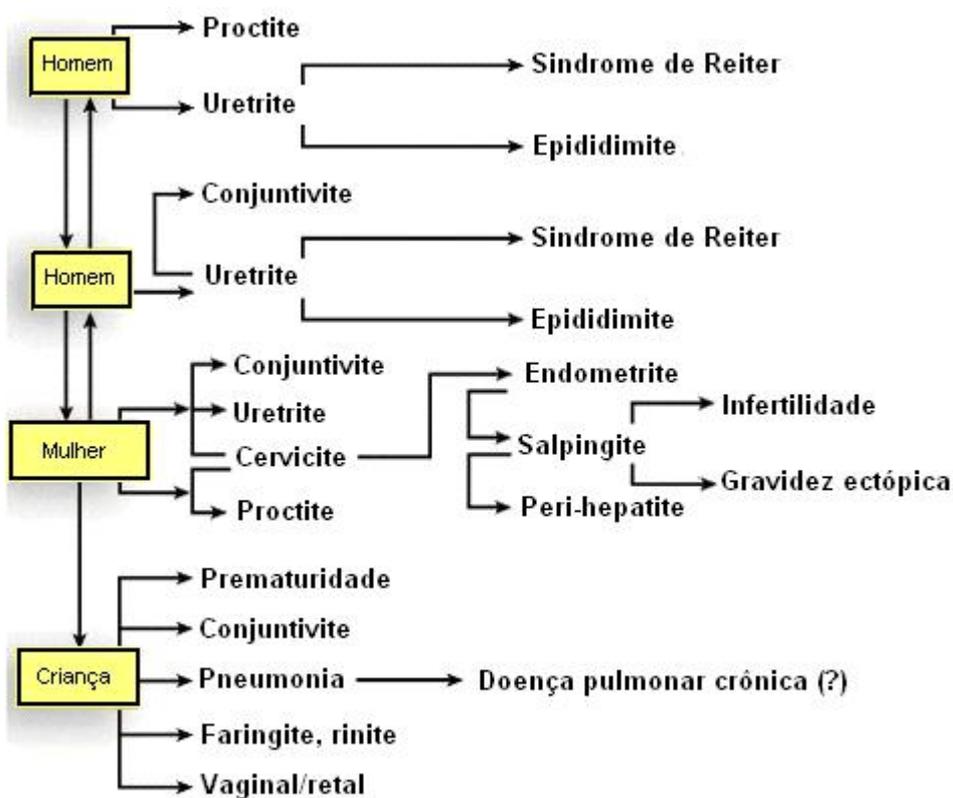


Figura 3. Padrões de transmissão da *C. trachomatis* sorotipos de D a K. (Stamm *et al.*, 2005.)

1.6.3.1 Conjuntivite de Inclusão

A conjuntivite aguda apresenta como sintoma, a sensação de um corpo estranho no olho e é geralmente unilateral. A antibióticoterapia sistêmica resolve os sintomas da ceratite em 48 horas; 50% dos adultos com conjuntivite são contaminados por *C. trachomatis* do trato genital e a transmissão de indivíduo a indivíduo pode ocorrer sem contato sexual.

O uso de tetraciclina, macrolídeos e fluoroquinolonas são indicados para o tratamento (Jones, 1995).

1.6.3.2 Doenças urogenitais

Entre os homens heterossexuais a infecção por *C. trachomatis* é assintomática em mais de 50% dos casos e acomete apenas a uretra. Os sintomas quando surgem, de 1 a 3 semanas após a exposição, são muito semelhantes aos da gonorréia. O CDC aconselha tratamento anticomunicação para todos indivíduos com gonorréia, pois, a *C. trachomatis* está associada a esta doença em 30% dos casos e também é responsável por 30% a 50% dos casos de uretrite não gonocócica (Blake, 1997; Warford *et al.*, 1999). Entre os homossexuais masculinos, 4% a 8% 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).

As drogas de escolha para casos de uretrite não complicados são a eritromicina como primeira escolha, doxamiclina, ofloxacina e a azitromicina que apesar de maior custo, pode ser utilizada em dose única (Stamm *et al.*, 2005).

As complicações primárias da uretrite clamidial nos homens são a epididimite, artrite reativa incluindo síndrome de Reiter e a transmissão para as mulheres (Stamm *et al.*, 2005).

Epididimite ou infecção dos dutos espermáticos dos testículos é a complicação mais importante da uretrite por clamídia no homem jovem, sexualmente

ativo. As infecções não tratadas podem conduzir 1% dos homens contaminados a desenvolver a síndrome de Reiter, que representa uma doença sistêmica dolorosa, pois além da uretrite, as manifestações clínicas clássicas também incluem conjuntivite e artrite (Black, 1997).

A artrite sexualmente reativa é uma resposta imune inflamatória nas articulações a uma infecção primária de mucosa. A *C. trachomatis* pode estar presente nas juntas dos pacientes afetados em uma forma persistente, não cultivável. Estes organismos já foram identificados por microscopia eletrônica, coloração imuno-citoquímica e técnicas moleculares de hibridização e amplificação de ácidos nucléicos em membrana sinovial de pacientes com síndrome de Reiter. O tratamento aconselhável é o mesmo usado nas uretrites (Stamm *et al.*, 2005).

Nas mulheres, *C. trachomatis* causa mais de 20% das cervicites mucopurulentas, onde 70% são assintomáticas e a cérvix pode apresentar-se normal ou friável. Entre as mulheres com cervicite gonocócica 50% apresentam uma infecção concomitante por clamídia. Esta bactéria também pode ser detectada em urina de mulheres jovens com síndromes uretrais, caracterizadas por disúria, dor suprapúbica, urgência e aumento da frequência urinária (Jones, 1995).

Os organismos podem ascender da cérvix para o baixo abdômen causando doença inflamatória pélvica (DIP) que engloba suspeita clínica de endometrite e, ou, salpingite. Dos casos de DIP, 20% evoluem para esterilidade, 18% apresentam dor pélvica crônica e 9% tem episódio de gravidez tubária (Jones, 1995; MMWR, CDC, 2002).

Estima-se que 50% das mulheres com cervicite tenham endometrite apresentando sangramento uterino inter menstrual, acompanhado ou não por dor pélvica (Jones, 1995).

Salpingite é a inflamação das trompas de falópio detectada em 10% das mulheres com cervicite clamidial. Através das trompas os organismos podem se espalhar na superfície do fígado causando peri-hepatite. A salpingite é a maior causa de gravidez ectópica e infertilidade, e a gravidez ectópica é responsável por 10% de todas as mortes maternas. O risco de esterilidade resultante da salpingite alcança

75% em mulheres que tiveram três ou mais episódios documentados de infecção por *C. trachomatis* (Jones, 1995; Blake, 1997; Warford *et al.*, 1999). Fatores imunopatológicos do hospedeiro estariam associados à evolução da doença inflamatória pélvica, pois a infecção tubária pode persistir mesmo após antibióticoterapia (Mardh, 2004).

A prevalência de *C. trachomatis* em gestantes varia de 2% a 35%, e em mulheres grávidas; a presença de títulos de imunoglobulina M (IgM) contra a bactéria caracteriza um alto risco para partos prematuros. O diagnóstico e tratamento das mulheres infectadas durante a gravidez e seus parceiros, irão prevenir problemas de DIP pós-parto e de doença perinatal (Blake, 1997).

O tratamento durante a gestação é feito com eritromicina, amoxicilina e azitromicina. A doxiciclina e ofloxacina são contra-indicados na gravidez.(Stamm *et al.*, 2005).

1.6.4 Infecção perinatal

C. trachomatis é a causa mais comum de conjuntivite neonatal e umas das mais comuns causas de pneumonia na primeira infância (Black, 1999).

A conjuntivite de inclusão é geralmente adquirida no canal do parto infectado e pode ter resolução espontânea de 3 a 12 meses, mas infecção sub-clínica pode permanecer por vários anos, com poucas seqüelas. Rinites mucopurulenta e vulvovaginite nas meninas estão freqüentemente associadas à conjuntivite. O tratamento profilático dos olhos com nitrato de prata não previne a infecção, pois as crianças são carreadoras nasofaríngeais da bactéria (Black, 1999; Stamm *et al.*, 2005).

Dos neonatos de mães infectadas, entre 11% e 20% desenvolvem pneumonia. Os sintomas surgem de 4 a 11 semanas de vida com obstrução nasal, tosse, e infiltrado intersticial pulmonar. Crianças com pneumonia clamidial não tratada correm o risco de apresentar mais tarde na infância, disfunção pulmonar e doença respiratória crônica (Black, 1999; Stamm *et al.*, 2005).

Infecção perinatal por *C. trachomatis* pode persistir na nasofaringe, trato urogenital ou retal por mais de 2 anos, o que torna muito difícil sua diferenciação da infecção adquirida por abuso sexual. Já em crianças maiores, a *C. trachomatis* deve ser diferenciada da *C. pneumoniae*. Por esta razão o único teste aceitável para o diagnóstico de infecções na genitália, reto e orofaringe em crianças é a cultura de células com anticorpo fluorescente específico para detectar as inclusões clamidiais (Stamm *et al.*, 2005).

A *triagem* pré-natal para clamídia e o tratamento de mulheres infectadas previnem a infecção da criança, em torno de 90%. Porém, a re-infecção depois do primeiro trimestre é freqüente em populações de risco, como as adolescentes. O tratamento tópico das conjuntivites não é recomendado, a terapia recomendada é a eritromicina via oral (Stamm *et al.*, 2005).

1.7 Fatores demográficos e risco para as infecções por *C. trachomatis*

A correlação demográfica mais comum da infecção por *C. trachomatis* é em mulheres com menos de 20 anos de idade. A base biológica para esta associação aparentemente seria diferenças anatômicas na junção escamo-colunar da cérvix dessas mulheres, apresentando ectopias, que facilita a exposição do hospedeiro ao agente infeccioso.

Fatores demográficos associados com mulheres mais velhas incluem, *status* de solteira, nuliparidade, raça negra e baixas condições sócio-econômicas. Numerosos parceiros sexuais, um novo parceiro, o não uso de preservativos e a presença de infecção por *Neisseria gonorrhoeae* estão consistentemente associados com a infecção clamidial (Black, 1997).

1.8 Estratégia de prevenção

A estratégia de prevenção primária envolve a indução de mudança de comportamento para reduzir o risco da aquisição da infecção clamidial e de outras

doenças sexualmente transmissíveis. O comportamento que reduz o risco de infecção inclui a diminuição do número de parceiros, o uso de preservativos e o retardo da primeira relação sexual. Outra estratégia de prevenção seria a identificação e tratamento de indivíduos portadores da bactéria, antes que possam transmitir a infecção (Stamm *et al.*, 2005).

Programas que parecem efetivos na redução da transmissão de *C. trachomatis* incluem triagem da população de alto risco para infecções assintomáticas com notificação e tratamento do parceiro. A força tarefa do serviço de prevenção dos Estados Unidos (USPSTF) recomenda aos clínicos americanos a triagem preventiva para infecção clamidial em pacientes que se enquadrem nas características citadas na Tabela 2 (USPSTF, 2001; Stamm *et al.*, 2005). A partir de dezembro de 2000, o distrito de Columbia e 50 estados norte-americanos, acataram a lei de notificação dos casos de infecção por *C. trachomatis* (MMWR-CDC, 2002).

Tabela 2. Triagem para prevenção da infecção clamidial.

Triagem para infecção de <i>Chlamydia trachomatis</i> (USPSTF, 2001).
Triar todas as mulheres ≤ 25 anos sexualmente ativas
Triar mulheres de alto risco*
Triar mulheres grávidas ≤ 25 anos
Triar mulheres grávidas mais velhas de alto risco
As evidências são insuficientes para recomendar a triagem de homens

*Mulheres de alto risco são definidas como: solteiras, ≤ 25 anos, afro-americanas, DST anterior, novos ou múltiplos parceiros sexuais, ectopia cervical, inconsistente uso de preservativos

A triagem para *C. trachomatis* tem aumentado nos últimos anos devido aos novos testes de diagnóstico, novos métodos para coleta de amostras e novos dados de prevalência em diferentes populações. Apesar do endosso de órgãos de saúde pública pela triagem, algumas questões permanecem em discussão como, qual grupo deve ser

triado e com que frequência (Cook & Ostergaard, 2003). A introdução dos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) para *C. trachomatis* resultou em uma grande mudança no campo da prevenção, por apresentarem alta especificidade e sensibilidade, serem capazes de detectar pequenas quantidades do DNA clamidial em amostras de urina, *swabs* vaginais e vulvares e em absorventes sanitários (Stamm, 1999; Morré *et al.* 1999; Martin, 2000; Black & Morse, 2000; Alary *et al.*, 2001; Gaydos *et al.*, 2002, Schachter *et al.*, 2003). Estas amostras são adequadas apenas para NAAT, não sendo recomendadas para cultura por apresentarem baixo número de organismos viáveis (Sary, 1999).

A triagem randomizada já é uma realidade em alguns países da Europa. O material coletado pelo próprio paciente (urina masculina e urina e *swab* vulvo-vaginal de mulheres) é enviado pelo correio e analisado nos laboratórios credenciados. Na Dinamarca a *triagem* por via postal para *C. trachomatis* demonstrou ser efetiva e custo efetiva, já a Inglaterra está na fase introdutória de implantação no programa nacional de triagem clamidial (Macleod *et al.*, 2005).

1.9 Métodos de diagnóstico laboratorial para *Chlamydia trachomatis*

Entre as infecções por *C. trachomatis* apenas o tracoma clássico pode ser diagnosticado clinicamente. Atualmente, o diagnóstico dessa bactéria inclui uma vasta gama de opções que apresentam vantagens e desvantagens, sendo a escolha do teste determinada pelo tipo de material analisado (Jones, 1995; Francisco, 2001).

1.9.1 Coleta e transporte de amostras clínicas

C. trachomatis é um agente intracelular obrigatório, e assim, a coleta deve objetivar a obtenção de células do hospedeiro que abriguem o microrganismo. Testes mais sensíveis como as tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos não necessitam de corpos elementares intactos uma vez que, teoricamente, apenas poucas cópias de genes podem ser detectadas (Black, 1997).

Clamídias são bactérias relativamente lábeis e a viabilidade destas pode ser mantida conservando-se a amostra clínica refrigerada e minimizando-se o tempo entre a coleta e processamento no laboratório. A realização do cultivo celular de *C. trachomatis* é recomendada exclusivamente para amostras de sítios 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 o 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 infecção 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 (NAAT) para detecção de *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 do 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 *N. gonorrhoeae* por PCR. Isto abre a possibilidade do paciente coletar seu próprio material e enviá-lo pelo correio para análise em centros especializados (Gaydos & Rompalo, 2002).

1.9.2 Isolamento em cultivo celular

C. trachomatis é cultivada após inoculação da amostra em uma mono camada de cultura de células, sendo as células de McCoy e HeLa as mais utilizadas. A incubação ocorre de 40 a 72 horas dependendo do tipo do cultivo e sorotipo clamidial (Stamm *et al.*, 2005).

As inclusões intracitoplasmáticas podem ser detectadas após coloração pelo Giemsa, Macchiavello, Gimenez, lugol ou por imunofluorescência (Stamm *et al.*, 2005). O método de escolha é o uso de anticorpos monoclonais fluorescentes espécie-específicos, que se ligam a MOMP, com uma especificidade próxima dos 100% (Black, 1997) (Figura 4).

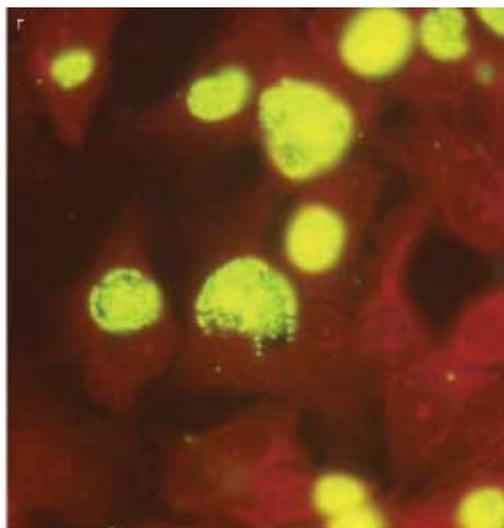


Figura 4. Cultura de *Chlamydia trachomatis* corada com anticorpos fluorescentes (Stamm *et al.*, 2005).

Estima-se que a sensibilidade da cultura seja de 70% a 80% em laboratórios especializados, e a especificidade alcança os 100%, motivo pelo qual a cultura é o único teste que deve ser usado para estabelecer a presença ou ausência de infecção em situações com implicações legais, como em casos de estupro e abuso sexual de

crianças (CDC, MMWR, 2002; Stamm *et al.* 2005). Contudo, novos testes moleculares baseados em técnicas de RFLP (polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição) podem ser úteis na identificação das similaridades ou diferenças dos sorotipos de *C. trachomatis* nestes casos (Warford *et al.* 1999).

As desvantagens da cultura estão baseadas na sua relativa baixa sensibilidade, restrições quanto ao transporte das amostras, no fato das técnicas de cultivo serem laboriosas e complexas levando de 3 a 7 dias para obtenção de resultados, por apresentarem custo elevado e dificuldades na padronização. Com o advento das técnicas de amplificação dos ácidos nucleicos os testes de cultivo estão sendo menos usados, e feitos apenas por laboratórios especializados (Black, 1997; CDC, MMWR, 2002). A cultura de células foi considerada o padrão ouro para detecção de *C. trachomatis*, contudo, com a introdução das técnicas de amplificação, está evoluindo a criação de um padrão ouro expandido que além da cultura inclua um método de amplificação de ácido nucleico (Black, 1997; Warford *et al.*, 1999).

1.9.3 Técnicas não culturais para detecção de antígeno

1.9.3.1 Exame citológico direto

Em conjuntivites de inclusão infantil e no tracoma ocular, inclusões intracitoplasmáticas típicas podem ser identificadas em raspado de células conjuntivais coradas pelo Giemsa. Estas preparações coradas são positivas para *C. trachomatis* em 90% das crianças com conjuntivite neonatal e em 50% dos adultos com conjuntivite de inclusão. A citologia também pode ser usada para avaliar esfregaços endocervicais, inclusive aqueles corados pelo Papanicolau; contudo, a interpretação é difícil com baixa sensibilidade e especificidade. O diagnóstico citológico vem sendo substituído por testes de amplificação de ácidos nucleicos, muito mais sensíveis e específicos (Stamm *et al.*, 2005).

1.9.3.2 Técnicas com anticorpos fluorescentes

Os anticorpos monoclonais conjugados com a fluoresceína são utilizados como corante de esfregaços para diagnosticar corpos elementares de *C. trachomatis*, em contraste com as demais técnicas citológicas que detectam inclusões (Schachter & Stamm, 1999). O teste de imunofluorescência direta (IFD) apresenta a sensibilidade de 75% a 85% e a especificidade de 98% a 99% em relação à cultura, e sensibilidade mais baixa quando comparado com os testes de amplificação de ácidos nucléicos. Os anticorpos fluorescentes podem ser direcionados contra a MOMP ou o antígeno LPS. Porém, o antígeno LPS pode dificultar a leitura do teste por ter uma distribuição irregular na partícula clamidial. Esse procedimento possibilita um diagnóstico em torno de 30 minutos. Uma variação desta técnica envolve a centrifugação do meio de transporte usado para outros testes como a cultura de células e enzima-imunoensaio, corando o sedimento com reagente fluorescente para confirmar resultados positivos (Mahony *et al.*, 2003).

1.9.3.3 Testes de enzima-imunoensaio (EIE)

Existem inúmeros testes de EIE no mercado para detectar o antígeno LPS clamidial em amostras clínicas. Esses produtos utilizam anticorpo monoclonal ou policlonal marcado com enzima, e são gênero-específicos. (CDC, MMWR, 2002; Mahony *et al.*, 2003). O produto final da atividade enzimática pode ser observado visualmente, com espectrofotômetro, fluorímetro ou quimioluminômetro automatizados. Se executada corretamente, a reação é proporcional à presença do antígeno nas amostras analisadas (Seadi, 2002).

A maior vantagem desse método é a automação, que permite um grande volume de testes por bateria, com um custo mais baixo e a possibilidade de detecção de organismos inviáveis (Warford *et al.*, 1999). Uma desvantagem é a impossibilidade de se avaliar a qualidade da amostra colhida. Porém, a maior desvantagem dos métodos de EIE por detectar LPS é o potencial para resultados falso positivos causados por reação cruzada com LPS de outros microrganismos,

incluindo outras espécies de clamídia (Warford *et al.*, 1999; CDC, MMWR, 2002). Devido ao número inaceitável de falso positivos em população de baixa prevalência (<5%), o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) recomenda o uso de um teste confirmatório que detecte um determinante antigênico diferente para todos os ensaios não culturais em população de baixa prevalência. Entre esses estão os testes que utilizam anticorpos bloqueadores e a IFD após centrifugação da amostra, para evidenciar microscopicamente os CEs típicos de *C. trachomatis* (Warford *et al.*, 1999).

1.9.3.4 Testes rápidos para detecção de antígeno

Também chamados de *point-of-care tests* (POC) empregam a tecnologia EIE baseados primariamente em captura de membrana ou imunodifusão em látex. Esses testes são executados no próprio consultório médico, pequenas clínicas, hospitais e centros de detenção sem a necessidade de equipamentos sofisticados, ficando prontos em 30 minutos. Os resultados são analisados por leitura visual e qualitativamente, sujeitos a todos os falso-positivos dos ensaios que utilizam anticorpos contra o LPS. Os resultados de um teste rápido sempre devem ser considerados presuntivos e se positivos devem ser refeitos em um laboratório de rotina. Tais testes são inapropriados, pois a sensibilidade e especificidade são tipicamente mais baixas, os controles são menos rigorosos e o custo maior do que os testes designados para uso em laboratório especializado (Black, 1997; CDC, MMWR, 2002). Os testes de moderada sensibilidade, como o POC, podem ser usados em cenários onde os pacientes não retornem para tratamento, e em populações onde a demora do tratamento poderá resultar em significativa transmissão de DST (Vickerman *et al.*, 2003).

1.9.4 Técnica não cultural para detecção de anticorpos

A infecção por *C. trachomatis* pode ser detectada indiretamente, pela presença de anticorpos contra a bactéria, no soro dos pacientes. A sorologia não é útil no diagnóstico da infecção clamidial no trato genital, porque os anticorpos estimulados pela presença do microrganismo são de longa duração e um teste positivo para anticorpos não diferenciará uma infecção prévia de uma recente (Black, 1997). A sorologia só é recomendada para o diagnóstico da doença ativa, em casos suspeitos de LGV e de pneumonia infantil (Jones, 1995).

A reação de fixação do complemento (RFC), detecta anticorpos fixadores do complemento que reconhece o antígeno gênero-específico LPS, e tem sido usado para o diagnóstico de infecção sistêmica por *C. trachomatis*, como o LGV, mas não é utilizado para o diagnóstico do tracoma, conjuntivite de inclusão e infecção do trato genital, nem possui papel significativo no diagnóstico de infecções neonatais (Francisco, 2001; Mahony *et al.*, 2003).

A micro-imunofluorescência (MIF) é considerada uma importante ferramenta de pesquisa epidemiológica para infecções por *C. trachomatis*. É o teste sorológico mais sensível e específico para as espécies clamidiais, por ser o único que detecta respostas espécie-específicas e sorotipo-específicas. A sorologia é particularmente importante no diagnóstico de infecções pulmonares de neonatos. Nestes casos, altos títulos de IgM ($> 1:32$), são encontrados com regularidade associados à doença. Os anticorpos IgG são menos discriminativos pois podem ser herança materna ainda circulante no sangue da criança (Black, 1997; Stamm *et al.*, 2005).

Teste de EIE também chamado ELISA apresenta reatividade para o antígeno LPS dos corpos elementares ou reticulares clamidiais. Assim como para os outros testes sorológicos, a dosagem de um título de anticorpos por EIE em uma amostra de soro não distingue uma infecção prévia de uma recente. Os testes de EIE devem ser usados apenas para soro-vigilância de populações de alto risco ou para a detecção de IgM em crianças com pneumonia clamidial, quando o teste por MIF não estiver

disponível. Outros testes sorológicos têm sido desenvolvidos, como os EIE de fase sólida ou *dot blot* (Black, 1997).

1.9.5 Técnicas de biologia molecular

1.9.5.1 Hibridização com sondas de DNA e RNA

Dois testes de hibridização de ácido nucléico foram aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para a detecção de *C. trachomatis* ou *N. gonorrhoeae*: o Gen-Probe PACE2 e o Digene Hybrid Capture (CDC, MMWR, 2002).

PACE2 é provavelmente o teste mais usado para detectar *C. trachomatis* em laboratórios de saúde pública nos Estados Unidos. Este teste emprega sondas de DNA quimioluminescentes, que hibridizam com uma seqüência espécie-específica que codifica para o 16S rRNA clamidial. O híbrido formado sofre um processo de absorção magnética e a resposta quimioluminescente é detectada quantitativamente em um luminômetro. As vantagens do teste são as mesmas dos outros métodos não culturais, a amostra clínica não precisa ser transportada a frio e permanecem estáveis quando guardadas. A principal desvantagem é a menor sensibilidade em relação aos testes de amplificação de DNA e os resultados positivos em população de baixa prevalência devem ser confirmados segundo orientação do CDC (Black, 1997).

Digene Hybrid Capture II, utiliza sondas de RNA específicas para seqüências de DNA genômico e do plasmídio críptico de *C. trachomatis* (CDC, MMWR, 2002). Este teste apresenta um componente de amplificação de sinais para aumentar a sensibilidade de detecção do microrganismo (Mahony *et al.*, 2003). Em amostras endocervicais este método de detecção alcançou sensibilidade e especificidade comparáveis aos métodos de amplificação de ácidos nucléicos (Girdner *et al.*, 1999).

1.9.5.2 Amplificação de ácidos nucléicos

O desenvolvimento de testes baseados na tecnologia de amplificação de ácidos nucléicos 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 nucléicos é altamente sensível (capaz de produzir um sinal positivo a partir de uma única cópia do DNA ou RNA alvo), específica e oferece a oportunidade de utilização de amostras coletadas por técnicas não invasivas para triagem de infecção em indivíduos assintomáticos, que normalmente não iriam procurar cuidados clínicos. Essa é a grande vantagem, já que a maioria das infecções clamidiais é assintomática, principalmente em mulheres (Black, 1997; CDC, MMWR, 2002).

Técnicas de amplificação são capazes de detectar a presença de ácidos nucléicos independente da viabilidade ou do estado de conservação do organismo alvo, produzindo um resultado positivo que pode ser discrepante do resultado cultural, quando os organismos forem inviáveis. Acredita-se que a “janela” para uma cultura negativa e um PCR positivo após tratamento com doxiciclina, chega a alcançar três semanas; após este período os dois testes devem apresentar resultados negativos. Existe, portanto, a vulnerabilidade dos testes de amplificação detectarem ácidos nucléicos residuais, que podem persistir muito mais tempo no ambiente do que os organismos viáveis, podendo ser uma fonte de contaminação dentro do laboratório. Essa limitação contribui para o fato da cultura ainda não ter sido substituída por essas técnicas como um padrão legal de diagnóstico para aplicação forense (Black, 1997).

Testes comerciais diferem em seus métodos de amplificação e em suas seqüências alvo para a amplificação de ácidos nucléicos. O Roche Amplicor® (manufaturado pela Roche Diagnostics Corporation, Suíça), utiliza testes em reação da cadeia da polimerase (PCR); o Abbott LCR® (Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois) utilizam a reação em cadeia da ligase (LCR); a Becton Dickinson BDProbeTec™ ET (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey) utilizam a amplificação por deslocamento da cadeia (SDA); a Gen-Probe APTIMA™

(Gen-Probe, Incorporated, San Diego, Califórnia) utilizam a amplificação mediada pela transcrição (TMA) (CDC, MMWR, 2002).

Todos estes métodos utilizam a amplificação enzimática de ácidos nucleicos *in vitro*. As enzimas bacterianas DNA Taq polimerase e DNA ligase são usadas no PCR e LCR, respectivamente, para amplificar um segmento curto do DNA plasmidial de *C. trachomatis* em milhões de cópias idênticas. Essas cópias são geradas depois de repetidos ciclos térmicos em temperatura ótima que promove o anelamento dos iniciadores (*primers*) de nucleotídeos, e a atividade da polimerase ou ligase atua criando segmentos de ácido nucleicos complementares, seguidos por hibridização com sondas específicas. Ligação química de detectores ou sondas de captura permite ensaios colorimétricos do produto da amplificação de ácido nucleico especificamente hibridizado, de uma forma similar aos EIE. A maior vantagem do PCR e LCR é a alta sensibilidade, que excede a da cultura em até 20% (Warford *et al.*, 1999; Seadi, 2002).

O TMA é baseado na amplificação isotérmica do gene que codifica para o RNA ribossomal 23S e o alvo de RNA sofre transcrição reversa em cDNA. Uma grande vantagem deste método é que a reação de amplificação não requer o uso de um termociclador e permite obter cópias tanto do RNA como do DNA (Stary, 1999; Warford *et al.*, 1999; Nolte & Caliendo, 2003).

O SDA é um método que utiliza duas enzimas (uma DNA polimerase e uma enzima de restrição) e vários *primers*, uns definem o sítio de restrição e outros são específicos para o fragmento de DNA a ser identificado. O SDA assim como o TMA não requer o uso de um termociclador (Seadi, 2002).

A PCR é a tecnologia de amplificação do DNA mais conhecida, foi desenvolvida no início de 1980, mas só foi aprovada comercialmente para diagnóstico após 8 anos de estudos. No início do processo, existia um grande temor pelos resultados falso positivos por contaminação pelo DNA, que foram corrigidos aplicando-se as boas práticas na rotina laboratorial e pela descontaminação das superfícies e separação de áreas físicas para a extração do material genético das amostras clínicas daquele onde é realizada a amplificação e detecção (Black, 1997).

Atualmente, a grande preocupação está centrada nos resultados falso negativos devido à presença de substâncias inibidoras da reação da polimerase normalmente existentes em materiais clínicos humanos. Os inibidores ocorrem de forma imprevisível, e são detectados apenas pelo uso de controles de amplificação (ex: *primers* da beta globulina humana), pela repetição do PCR após diluição da amostra ou pela contaminação da amostra com o DNA clamidial fazendo o teste em duplicata; tudo isso aumenta os custos do exame, quando se pensa em aplicação em uma rotina laboratorial (Black, 1997).

Com relação às seqüências alvo de amplificação que já foram testadas temos o plasmídeo críptico e genes cromossomais, incluindo aqueles que codificam a MOMP, rRNA, e proteínas da membrana ricas em cisteína. Os testes de PCR baseados no plasmídeo demonstraram ser de 10 a 100 vezes mais sensíveis do que aqueles baseados no cromossoma, pois o plasmídeo está presente em múltiplas cópias (de 7 a 10) em *C. trachomatis*, propiciando um maior número de alvos para a reação (Mahony *et al.*, 1993).

Nested PCR tem sido aplicado para sorotipagem de *C. trachomatis* urogenital, tendo como alvo a região VD2 do gene *omp 1* (Molano *et al.*, 2004).

Real-time PCR é uma nova tecnologia que permite amplificação e análise simultâneas, utilizando sondas de hibridização fluorescentes e apresentando alta sensibilidade e especificidade para a detecção de *C. trachomatis*. Permite uma identificação rápida da bactéria em diversos tipos de amostras clínicas, eliminando a etapa pós-amplificação. Esta tecnologia é baseada na contínua detecção dos produtos de amplificação à medida que estes são formados, dentro dos tubos, sem a necessidade de abrí-los, evitando contaminação. Todo o processo ocorre em 2 horas e um controle interno integrado ao sistema detecta resultados falso negativos e condições errôneas da PCR (Eickhoff *et al.*, 2003; Wittwer & Kusukawa, 2003).

A tecnologia dos Microarranjos de DNA possibilita a hibridização de ácidos nucléicos com um grande número de oligonucleotídeos ou fragmentos de DNA imobilizados em uma pequena superfície que oferece a mais rápida e prática ferramenta para detectar a presença ou ausência simultânea de um grande conjunto

de genes de bactérias ou vírus patogênicos (Shi *et al.*, 2005). Esta tecnologia também pode ser empregada para estudo de polimorfismos gênicos em isolados de *C. trachomatis* (Brunelle *et al.*, 2004).

A PCR tem sido aplicada à técnica de Microarranjos de DNA, seja amplificando regiões do operon rRNA para identificação e genotipagem das diversas espécies de clamídias (Sachse *et al.*, 2005) como no formato multiplex, amplificando regiões gênicas conservadas, de bactérias causadoras de DST entre elas a *C. trachomatis* (Shi *et al.*, 2005). Porém, esta tecnologia ainda não está disponível para a rotina laboratorial de análises clínicas.

1.9.5.3 Performance dos diferentes testes para o diagnóstico de *Chlamydia trachomatis*

A Tabela 3 correlaciona valores de sensibilidade, especificidade e o nível de detecção dos corpos elementares (CE) clamidiais, dos testes comerciais utilizados no diagnóstico de *C. trachomatis*. Os testes de amplificação de ácido nucléicos (NAAT), são em geral de 15% a 20% mais sensíveis do que a cultura e de 40% a 50% mais sensíveis do que os testes de enzima-imunoensaio (EIE), imunofluorescência direta (IFD) e sondas de ácido nucléico sem amplificação. A especificidade é elevada para todos (Stamm *et al.*, 2005).

Tabela 3. Performance dos testes diagnósticos para *Chlamydia trachomatis*.

Testes	S (%) *	E (%)	Nível de detecção (CE)
EIE	40-60	99,5	1.000 -10.000
Sonda genética	40-65	99,0	1.000-10.000
IFD	50-80	99,8	50-100
Cultura	50-90	99,9	10-100
	Cérvice	81-100	
NAAT	Urina F	80-96	99,7
	Urina M	90-96	1-10

* Em relação ao padrão ouro expandido, combinação de diferentes metodologias

1.9.5.4 Performance dos NAAT para o diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* em urina, envolvendo pelo menos um kit comercial aprovado pelo FDA

A Tabela 4 demonstra os valores mínimos e máximos, da sensibilidade e especificidade alcançados pelos testes comerciais de amplificação de ácidos nucléicos em amostras urinárias em algumas publicações entre 1993 e 2005 (Jaschek *et al.*, 1993; Skulnick *et al.* 1994; Toye *et al.*, 1996; Quinn *et al.*, 1996; Chernesky, *et al.*, 1996; Pasternack *et al.*, 1997; Chernesky *et al.*, 1997; Goessens *et al.* 1997; Schepetiuk, *et al.*, 1997; Young *et al.*, 1998; Gaydos *et al.*, 1998; Puolakkainen *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1999; Vincelette *et al.*, 1999; Morre *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000; Van Der Pol *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2000; Airell *et al.*, 2000; Chan *et al.*, 2000; McCartney *et al.*, 2001; Van Der Pol *et al.*, 2001; Van Doornum *et al.*, 2001; Semeniuk *et al.*, 2002; Joyee *et al.*, 2003; Gaydos *et al.*, 2003; Gaydos *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2004; Chernesky *et al.*, 2005). Sendo que para a PCR, o valor médio de sensibilidade das amostras de urina feminina foi de 90,7% e 92,9% para as amostras masculinas, a especificidade alcançou a média de 99,4% em mulheres e 99,0% nos homens.

Tabela 4. Sensibilidade e especificidade de NAAT para detecção de *Chlamydia trachomatis*

Métodos de amplificação de ácidos nucléicos em urina								
PCR		TMA		LCR		SDA		
S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	S (%)	E (%)	
F	76.6-100	97.6-100	80.8-100	98.6-100	75.0-96.0	97.5-100	77.3-96.0	96.0-100
M	77.3-100	95.7-100	85.0-100	98.1-99.1	75.0 - 100	90.6 -100	94.6-96.0	89.0-100

Todas as referências utilizaram como padrão a cultura ou outro teste molecular de amplificação.
S: Sensibilidade; E: Especificidade; F: Feminino; M: Masculino.

2 Justificativa

Laboratórios de referência em saúde pública têm importante missão no fornecimento de dados precisos ao controle epidemiológico de doenças, na realização de análises especializadas e na pesquisa e desenvolvimento na área da saúde humana. Porém, muitos são os percalços na rotina dessas instituições. O sucateamento da rede pública de saúde força a 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. Como os *kits* comerciais são dispendiosos para os laboratórios que trabalham com saúde pública, a alternativa diagnóstica para estes serviços tem se baseado na implantação dos métodos moleculares *in house*, que são padronizados no local de uso e com reagentes próprios. Os resultados têm sido satisfatórios na identificação de um grande número de patologias infecciosas e genéticas, porém as técnicas *in house* exigem alto padrão de controle de qualidade e profissionais bem treinados.

As doenças sexualmente transmissíveis (DST) são um grande problema de saúde pública, pois se apresentam em elevado e crescente número de casos, consumindo muitos recursos para prevenção, diagnóstico e tratamento.

A infecção por *C. trachomatis* é considerada a mais prevalente DST bacteriana em todo o mundo, pois quando não tratada a infecção clamidial pode provocar seqüelas em mulheres, como gravidez ectópica ou infertilidade e nos homens a epididimite e a artrite reativa são as seqüelas mais graves.

A infecção prévia por *C. trachomatis* em mulheres portadoras do Papilomavirus humano oncogênico (HPV), favorece a persistência viral, considerada fator de risco para o desenvolvimento do câncer cervical e tem sido associada

também ao aumento da taxa de transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV).

O grande desafio do controle da infecção clamidial é que a maioria dos indivíduos infectados são assintomáticos resultando em um grande reservatório de indivíduos desconhecidos, infectados, capazes de transmitir a infecção aos seus parceiros sexuais.

Por ser um microrganismo de crescimento intracelular e os métodos convencionais de diagnóstico apresentarem baixa sensibilidade de detecção, as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) têm se mostrado como uma alternativa metodológica de crescente interesse para o diagnóstico de *C. trachomatis*, em saúde pública.

NAATs comerciais têm sido sugeridos para programas de triagem desta bactéria em populações com alta ou baixa prevalência, principalmente através da análise de urina por ser uma forma de coleta não invasiva, que favorece a adesão dos participantes assintomáticos ao programa. Estes testes apresentam custo final elevado, permanecendo inacessíveis à realidade da saúde em nosso país e até mesmo para os laboratórios menores de países desenvolvidos.

Este trabalho propõe a implantação de uma técnica de PCR *in house* para a detecção de *C. trachomatis* em amostras de urina masculina, oportunizando o diagnóstico da infecção clamidial em pacientes sintomáticos e assintomáticos, pois 60% de homens com sintomas de uretrite atendidos na rede pública ficam sem tratamento adequado por falta de diagnóstico, assim como os portadores assintomáticos permanecem capazes de transmitir a infecção aos seus parceiros sexuais.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método por PCR para a detecção da infecção por *C. trachomatis* em amostras de urina masculina, no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Rio Grande do Sul (IPB/LACEN-RS, CDCT, FEPPS).

3.2 Objetivos Específicos

- 1 - Comparar os resultados do protocolo de PCR *in house* com um método molecular comercial (Sistema COBAS Amplicor, Roche).
- 2 - Determinar a especificidade dos *primers* escolhidos.
- 3 - Determinar a sensibilidade analítica do protocolo *in house*.
- 4 - Pesquisar possíveis inibidores da PCR *in house* em urina.

4 Materiais e Métodos

4.1 Amostras clínicas e pacientes

Foram utilizadas neste estudo 111 amostras de urina masculina, colhidas no período de agosto a dezembro de 2003, que fazem parte de um grande banco de amostras do Estudo de Prevalências e Frequências Relativas das DST no Brasil (Ministério da Saúde).

Esta amostragem compreende dois grupos de pacientes: i) homens com sinais e ou sintomas de doença sexualmente transmitida (DST), atendidos em serviço especializado; ii) homens (industriários) sem sinais e ou sintomas de DST que forneceram a amostra em seu ambiente de trabalho.

4.1.1 Critérios de inclusão para homens com sintomas e ou sinais de DST.

- ✓Qualquer faixa etária.
- ✓Primeira consulta para o problema atual.
- ✓Que não tivesse recebido tratamento ou utilizado por conta própria qualquer antibiótico oral, injetável ou tratamento tópico nos últimos 15 dias.

4.1.2 Critério de exclusão para homens com sintomas e ou sinais de DST.

- ✓Aqueles que soubessem ser soro positivo para o HIV ou, por esse motivo, estivessem em acompanhamento médico no serviço de saúde.

4.1.3 Critérios de inclusão para homens sem sinais e ou sintomas de DST.

- ✓Industriários, sexualmente ativos.
- ✓Qualquer faixa etária.
- ✓Que trabalhassem nas linhas de produção.

✓Que não tivessem ingerido antibióticos nos últimos 15 dias.

4.1.4 Critério de exclusão para homens sem sinal e ou sintomas de DST.

Todos os industriários que durante a entrevista se queixaram de qualquer sintoma ou sinal relacionado a DST (corrimento, úlcera, ou verruga genital).

Todos os pacientes foram selecionados por profissional da área da saúde, e encaminhados para uma entrevista onde responderam a um questionário e assinaram um termo de consentimento para participarem do estudo.

4.2 Coleta, transporte e estoque das amostras clínicas.

Cada participante após a entrevista recebeu um frasco estéril de 50 mL, devidamente etiquetado, para auto-coleta do primeiro jato de urina, a qualquer hora do dia, com uma abstinência de pelo 3 horas após a última micção. As amostras clínicas colhidas foram armazenadas entre 2°C e 8°C (geladeira) e transportadas para o laboratório em caixa térmica com gelo num prazo máximo de 24 horas após a coleta.

Os espécimes clínicos foram distribuídos em 3 frascos com 5 mL cada e processados no Instituto de Pesquisas Biológicas – Laboratório Central de Saúde Pública (IPB/LACEN-RS). As amostras foram mantidas a -20°C sem conservante.

4.2.1 Seleção das amostras clínicas

Dos 232 industriários analisados (estudo do Ministério da Saúde não publicado), 8 apresentaram resultado positivo para *C. trachomatis* pelo Sistema Automatizado COBAS Amplicor (Roche Diagnostics, Branchburg), e dos 138 pacientes provenientes de clínica de DST, 29 apresentaram positividade, frente ao mesmo teste diagnóstico. Para a padronização do método proposto foram selecionadas todas as 37 amostras de urina testadas positivas para *C. trachomatis*

pelo Sistema Automatizado COBAS Amplicor. Foram utilizadas 74 amostras de urina negativas para *C. trachomatis* também testadas pelo COBAS Amplicor distribuídas da seguinte forma: 16 de industriários; 29 de pacientes de clínica DST, que não apresentaram nenhum microrganismo na região uretral; e, 29 de pacientes de clínica de DST sem *C. trachomatis*, mas com outros microrganismos detectados na região uretral (gonococo ou HPV baixo e alto risco). Gonococos foram detectados na mesma amostra de urina pelo Cobas Amplicor e HPV foi detectado por Captura Híbrida (Digene) em raspado prepucial dos homens com queixa de DST.

4.3 Análise das amostras pelo Sistema Automatizado COBAS Amplicor

No Analisador Automático COBAS Amplicor, os testes foram realizados em 4 etapas:

4.3.1 Preparação de reagente (pré-PCR)

Master Mix é o reagente primário utilizado na PCR. Nos *kits* Amplicor este reagente contém os seguintes componentes que permitem a amplificação específica da seqüência alvo:

- Unidades individuais de nucleotídeos (dNTPs): dATP, dGTP, dUTP e dCTP.
- Cofator da enzima *Taq*DNA polimerase: Mg^{2+} .
- *Taq*DNA polimerase, enzima utilizada para replicar o DNA.
- *AmpErase* (UNG): Uracila-N-glicosilase, enzima que elimina *amplicons* contaminantes que contenham uracila, antes do início da amplificação, promovendo a amplificação seletiva de ácidos nucléicos.
- Tampões: usados para manter adequados o pH e a concentração de sal.
- Iniciadores: são *primers* biotinizados CP24 e CP27, que flanqueiam uma seqüência de 207 pb do plasmídeo críptico de *C. trachomatis*. Esta seqüência se localiza 195 pb *downstream* do sítio único de restrição de BamHI.

4.3.2 Preparação da amostra (pré-PCR)

As urinas foram tratadas para extração do DNA de *C. trachomatis* de acordo com instruções do fabricante, utilizando-se o volume de 500 µL da amostra clínica.

4.3.3 Amplificação (PCR)

Após ser extraído da amostra, o ácido nucléico do patógeno foi colocado em um tubo de ensaio com o reagente *Master Mix*. A reação de amplificação constou 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 foi mantida a 72°C até a adição da solução de desnaturação (NaOH). O controle interno da reação (CI) consistiu de uma seqüência aleatória de DNA com extremidades de ligação complementares aos *primers* do plasmídio de *C. trachomatis*. Ele tem, essencialmente, o mesmo conteúdo de bases e uma região complementar a uma sonda de ligação que permite ao *amplicon* do CI ser diferenciado do *amplicon* alvo. O CI foi amplificado e detectado junto com a amostra-alvo para identificar os inibidores da amplificação da PCR.

4.3.4 Detecção (pós-PCR)

Imediatamente após a amplificação, cada fita de DNA foi quimicamente desnaturada pela adição automática de uma solução alcalina ao tubo contendo o *amplicon*. Depois da desnaturação, uma alíquota de cada amostra foi automaticamente transferida para o tubo de detecção (*D-Cup*), e transferido para uma incubadora a 37°C com uma solução de hibridização, contendo sondas de oligonucleotídeos específicas para cada teste, e adsorvidas em micropartículas magnéticas. As sondas têm sítios de ligação que são complementares à seqüência alvo. Durante a hibridização, o *amplicon* livre foi hibridizado pelas sondas cobertas com as micropartículas magnéticas que são imobilizadas por um ímã, enquanto o

amplicon não ligado é removido com lavagens, restando apenas o *amplicon* hibridizado com as micropartículas magnéticas. A reação de hibridização define a especificidade do teste, por esta razão é uma etapa crítica no processo de detecção. A solução de conjugado avidina-*horseradish* peroxidase (Av-HRP) foi automaticamente adicionada a cada *D-cup* e incubada a 37°C. A avidina tem alta afinidade pela biotina; assim a avidina-*horseradish* peroxidase liga-se ao *amplicon* biotinilado previamente ligado as micropartículas magnéticas. O *D-cup* foi levado automaticamente para a incubadora. Durante a terceira incubação o substrato tetrametilbenzidina (TMB) e a solução de peróxido de hidrogênio foram adicionados. Na presença do peróxido de hidrogênio, a peroxidase ligada catalisa a oxidação da TMB para formar um complexo de cor azul.

Após a incubação o *D-cup* foi transferido automaticamente para o fotômetro onde a leitura da absorbância foi feita em 660 nm e a absorbância do substrato *blank* foi subtraída da absorbância da solução de reação de cada *D-cup*. A intensidade da luz transmitida ao passar pela solução contida no *D-cup* foi medida por um fotodiodo que produz um fluxo de corrente proporcional à intensidade da luz transmitida. Os resultados finais foram transferidos a uma impressora (Loeffelholz *et al.*, 1992; Roche, 1999).

4.4 Protocolo *in house* para detecção de *Chlamydia trachomatis*

As urinas selecionadas para a pesquisa de *C. trachomatis* foram submetidas ao protocolo de PCR *in house* descrito por Lan *et al.* (1993) e modificado no presente trabalho.

4.4.1 Extração e purificação do DNA da amostra clínica

Utilizou-se um volume de urina de 500 µL, e cada extração de DNA foi acompanhada de um controle negativo. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 minutos e o sedimento foi lavado com tampão TE 1x (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e novamente centrifugadas nas mesmas condições. O

sedimento foi ressuspensionado em 100µL de TE 1x e levado à fervura por 10 minutos. O DNA liberado foi purificado com DNAzol (Gibco BRL and Life Technologies, Rockville, Md), conforme procedimento publicado por Chomezynski *et al.* (1997). O método baseia-se no uso de uma solução detergente de guanidina que hidroliza o RNA permitindo uma precipitação seletiva do DNA das células lisadas (Rodrigues *et al.*, 2002).

Uma segunda etapa de purificação com fenol-clorofórmio foi acrescentada visando reduzir a presença de inibidores da reação de PCR, freqüentes em amostras de urina, tais como hemoglobina, uréia, hormônios, cristais e bactérias (Toye *et al.*, 1998; Mahony *et al.*, 1998; Blake & Morse, 2000; Betsou *et al.*, 2003). O volume final do produto da extração foi de 40 µL, armazenado sob refrigeração (4°C a 8°C) até o processamento da PCR.

4.4.2 Reação de amplificação

O DNA purificado das amostras foi submetido à amplificação por PCR, utilizando os *primers* CTP1 e CTP2 que define um segmento de 201 pb (Griffais & Thibon, 1989). Este segmento localiza-se na ORF de número 4 do plasmídio críptico de *C. trachomatis* a 2.940 pb do sítio único de restrição da enzima BamHI. Alvos plasmidiais são bastante utilizados por aumentarem a sensibilidade da reação de PCR, pois apresentam-se de 7 a 10 cópias por célula bacteriana, e sua seqüência é altamente conservada entre os diferentes isolados de *C. trachomatis*, estando presente em 99% das cepas desta espécie (Mahony *et al.*, 1993; Black, 1997; http://www.chlamydiae.com/docs/biology/genome_plasmid.asp; www.berkeley.edu:4231/index.html).

A seqüência dos *primers* utilizados foi:

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 μ L, continha 1,0 U da enzima Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, life Technologies), cada *primer* na concentração de 12,50 pmol; 3,0 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada desoxinucleosídeo trifosfato (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Invitrogen life Technologies), 10mM de Tris-HCL (pH 8,3) e 50 mM de KCl.

A amplificação foi realizada em termociclador MJ Research PTC 96 nas seguintes condições: 95°C por 4 minutos, para desnaturação, 40 ciclos subsequentes consistindo cada ciclo de: uma etapa de desnaturação a 95°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento a 57°C por 1 minuto e uma etapa de 72°C por 1 minuto para a extensão seguida por mais uma etapa a 72°C por 4 minutos, para a extensão final. As condições da reação foram baseadas no protocolo publicado por Lan *et al.*, (1993), com modificações na temperatura de anelamento e na concentração do $MgCl_2$.

Foram utilizados 10 μ L do DNA purificado a partir de amostra clínica. Cada reação possuía um controle negativo que continha apenas a mistura de reação adicionada de água ao invés do DNA e um controle positivo contendo 5 μ L de DNA genômico de *C. trachomatis* sorotipo L2, na concentração de 30 ng/ μ L ou utilizando um fragmento de 201 pb clonado em plasmídeo pUC18.

4.4.3 Análise dos produtos amplificados

A detecção do produto da amplificação foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com o brometo de etídio. O gel foi preparado, a quente, dissolvendo 1,5 g de agarose (GIBCO BRL-Life, EUA) em 100 mL de tampão TEB 1x (Tris-Borato_EDTA, Tris HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,2), ao qual foi adicionado brometo de etídio na concentração de 0,5 μ g/mL

Em 10 μ L do DNA amplificado foram acrescentados 2,0 μ L do tampão de amostra. Este tampão foi preparado com 0,25% de Azul de bromofenol (ICN Biomedicals Inc.), 25% de Ficoll 400.000 (Nycograde-Nycomed GIBCO BRL-Life Technologies, EUA) e 0,25% de Xileno-cianol FF (Sigma, USA). Este volume total de 10 μ L foi o mesmo inclusive para os controles positivos e negativos da reação e o

controle negativo da extração do DNA. O tamanho dos fragmentos gerados por amplificação foi controlado pelo uso de marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen Life Technologies).

TEB 1x foi usado como tampão para a eletroforese, realizada em um sistema de cuba horizontal HorizonTM 11-14 (Life Technologies GIBCO BRL, USA) a 100 V com corrente de 50 mA aplicados por 40 minutos à temperatura ambiente. Os géis foram observados em um transluminador de luz ultravioleta (UV) (Vilber Lourmat, France) e fotografados em um captador de imagens (Vilber Lourmat, France). O resultado foi considerado positivo para a presença de DNA de *C. trachomatis* quando visualizada a banda correspondente ao fragmento de 201 pb.

4.4.4 Hibridização dos produtos de PCR

Após a eletroforese, os produtos de PCR foram fotografados e transferidos do gel de agarose para uma 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, seqüenciado, originado da reação de PCR com *primers* CTP1 e CTP2 na concentração de 100 ng/μL. Este fragmento foi purificado pelo *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* que contém o substrato da enzima peroxidase (luminol) conforme as instruções do fabricante.

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

4.5 Obtenção do controle positivo para a PCR

C. trachomatis são bactérias intracelulares obrigatórias, que não se proliferam em meios de cultura comuns. Como não havia a disponibilidade de cultura de células, utilizamos microorganismos fixados em lâminas (*kit* comercial) e perpetuamos o fragmento de 201 pb através da clonagem em plasmídeo pUC18.

4.5.1 Extração do DNA de *Chlamydia trachomatis*

Para obter-se DNA genômico de *C. trachomatis* realizou-se a extração a partir de lâminas sensibilizadas com células clamidiais sorotipo L2 (*C. trachomatis* IgG IFA, Hemagen Diagnostics, Inc.). As lâminas foram raspadas com lâminas de bisturi e o material foi 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 260 nm no equipamento Genequant (Amersham Pharmacia Biotech).

4.5.2 Clonagem do fragmento de 201 pb 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 pUC18, 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 µg/mL), XGal (40 µg/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 µL do extrato foi submetido a PCR com os *primers* CTP1 e CTP2.

4.6 Determinação da especificidade dos *primers*

A especificidade da reação de PCR com os *primers* CTP1 e CTP2 foi determinada pela amplificação do DNA de microrganismos que podem ser encontrados em urina masculina causando infecção urinária, uretrite ou como simples flora comensal do aparelho gênito-urinário. Estes microrganismos foram isolados de amostras clínicas ou cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), e quantificados para posteriormente serem diluídos em urina negativa para *C. trachomatis* simulando uma infecção. A extração de DNA nas urinas contaminadas foi processada conforme o protocolo das amostras clínicas.

4.6.1 Escolha dos microrganismos para o teste de especificidade

Os microrganismos escolhidos para serem testados foram: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp* coagulase negativa, *Enterococcus faecalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis* e HPV (alto e baixo risco).

4.6.2 Quantificação das leveduras e bactérias cultiváveis em urina

Colônias de *E. coli*, *Ps. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Staphylococcus sp* coagulase negativa, *E. faecalis*, e *C. albicans*, foram diluídas em solução fisiológica estéril, segundo um padrão de turbidez de 0,5 da escala de McFarland que corresponde a uma suspensão bacteriana contendo $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (Mahon & Manuselis, 1995). 50 μ L desta solução foram usados para contaminar 450 μ L de urina com concentração final de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. A infecção foi confirmada inoculando-se 10 μ L desta preparação em agar sangue de carneiro a 5% e incubando por 24 hs à 35°C em estufa bacteriológica. A contagem de colônias foi superior a 100.000 UFC/mL em todas as amostras. A coloração de Gram ocorreu

simultaneamente, com uma contagem superior a 30 bactérias por campo de imersão, em um volume de 10 µL da solução bacteriana.

4.6.3 Quantificação de *Trichomonas vaginalis*

A contagem de *T. vaginalis* foi feita em câmara de Neubauer a partir da cepa ATCC 30236 cultivada em meio líquido, contendo 8.000 protozoários/µL. Após sucessivas diluições 450 µL de urina foi contaminada com 50 µl de uma solução contendo o equivalente a 4 *T. vaginalis* por µL (Strasinger, 1991).

4.6.4 HPV e *Neisseria gonorrhoeae*

Uma solução contendo raspado de células prepuciais, positivo por captura híbrida (Digene) para o vírus do HPV, baixo e alto risco, também foi utilizada em um volume de 50 µL para contaminar 450 µL de urina. Uma amostra de 500 µL de urina positiva para *N. gonorrhoeae* analisada por PCR comercial (COBAS Amplicor) foi utilizada diretamente por apresentar resultado negativo para *C. trachomatis*, pesquisada pela mesma metodologia.

4.7 Estudo do fragmento amplificado

Foram utilizados dois testes para confirmar a especificidade da seqüência de 201 pb obtidas após reação de PCR.

4.7.1 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 que apresenta um único sítio de restrição nesta seqüência. Na reação de clivagem foi utilizado tampão 10x (TRIS HCL 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM), 1 U de

EcoRV / μg de DNA amplificado. As reações foram realizadas a 37°C por 1 hora 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 visualizado em transluminador UV.

4.7.2 Seqüenciamento do produto amplificado

O fragmento de 201 pb, obtido após reação de amplificação de 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 o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing v 1.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems, USA). Foram utilizados os primers CTP1 e CTP2 na concentração de $3 \text{ nmol}/\mu\text{L}$ e 100 ng de produto amplificado e *Cycle Sequencing mix* em proporções indicadas pelo 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).

4.8 Determinação do limite de detecção analítica da PCR *in house*

Para a 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 das diluições de DNA variaram de $30 \text{ ng}/\mu\text{L}$ a $50 \text{ fg}/\mu\text{L}$.

4.9 Teste de inibição da PCR

Foram realizados dois testes para detectar inibição da reação de PCR, em amostras de urina positivas pelo COBAS Amplicor e negativas pela PCR *in house*.

4.9.1 Teste de contaminação com o DNA clamidial (*spiked*)

Um μl do DNA de *C. trachomatis* na concentração de 10 pg/ μL , próxima ao limite de detecção em gel de agarose, foi adicionado à mistura da reação de PCR juntamente com o DNA das amostras supostamente inibidas. A mesma quantidade de DNA clamidial foi amplificada como controle positivo da reação, e um controle negativo que não apresentava nenhum DNA foi utilizado (Chernesky *et al.*, 1996).

A análise foi feita depois de corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% e visualização em transluminador UV com marcador de tamanho molecular de 100 pb.

4.9.2 Teste de inibição com um controle interno da reação

Como controle interno para detectar inibição na reação de PCR para *C. trachomatis*, foram utilizados *primers* específicos para a amplificação de um fragmento de 264 pb da β globina do DNA humano (Swan *et al.*, 1999; Strauss *et al.*, 2002).

Seqüência dos *primers*:

PC04: 5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC – 3'

GH20: 5' –GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC – 3'

Usou-se na mistura da reação 1 μL de cada *primer* na concentração de 50 ng/ μL .

Foram processados 2 controles positivos para a reação, um positivo apenas para o DNA humano na concentração de 210 ng/ μ L (usamos 1 μ L), amplificado pelos primers da β globina (264 pb) e o segundo controle positivo com o DNA de *C. trachomatis* na concentração de 30 ng/ μ L (usamos 5 μ L) mais 1 μ L do DNA humano de 210 ng/ μ L. Um controle negativo da reação também foi processado.

A análise dos resultados foi realizada comparando as bandas de DNA que migraram por eletroforese nas mesmas condições descritas anteriormente, com um marcador de tamanho molecular de 100 pb.

4.10 Análise estatística

Foi feita uma análise descritiva dos dados, através de tabelas simples cruzadas de frequência e percentual. Com base nestas tabelas obtiveram-se os valores de sensibilidade (S) e especificidade (E). A acurácia do teste foi calculada e expressa graficamente na curva ROC, pela relação entre sensibilidade e especificidade (Fletcher *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 1997).

5 Resultados

Com o objetivo de padronizar uma técnica de amplificação de DNA para o diagnóstico de *C. trachomatis* em urina masculina, experimentos foram realizados e comparados com um teste para diagnóstico de amplificação molecular comercial, automatizado (COBAS Amplicor, Roche).

5.1 Adequação da temperatura de anelamento para o protocolo *in house*

O protocolo da amplificação por PCR proposto por Lan e colaboradores (1993), que utilizava 55°C como temperatura de anelamento, foi modificado como descrito a seguir. Além da temperatura proposta pelo autor, outras temperaturas foram testadas: 52°C, 54°C, 56°C, 58°C e 60°C e os resultados das amplificações estão mostrados nas figuras 5 e 6. A 52°C não houve amplificação de DNA em 4 amostras clínicas de industriários. Utilizando-se a temperatura de 54°C verificamos uma fraca amplificação do DNA das amostras de número 1 e 4 e, a 56°C observamos uma melhor visualização dos fragmentos esperados para as amostras 1, 3 e 4, tornando também o controle positivo mais evidente. As temperaturas de 58°C e 60°C apresentaram a mesma intensidade no fragmento do controle positivo e as amostras 1 e 3 puderam ser visualizadas. Portanto, a temperatura de 56°C foi escolhida como a ideal, sendo substituída por 57°C, após o teste de especificidade dos *primers*.

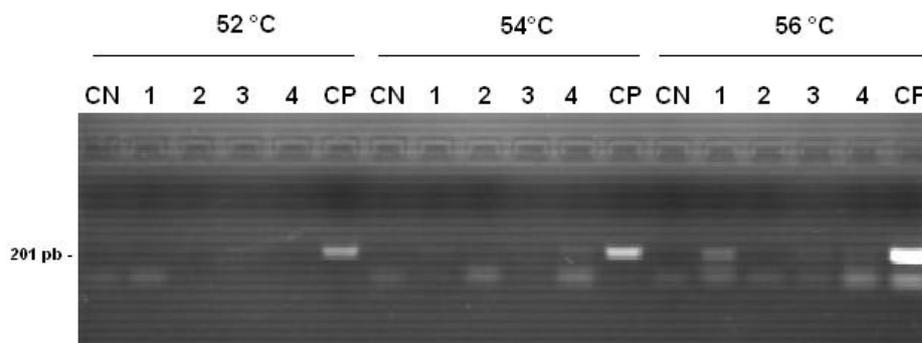


Figura 5. Teste de temperatura de anelamento a 52°C, 54°C, e 56°C. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de UV. CN: controle negativo da reação; 1, 2, 3 e 4: amostras clínicas de industriários, positivas para CT através da análise no COBAS Amplicor; CP: controle positivo da reação de amplificação, na concentração de 30 ng/μL representado por um fragmento de DNA clamidial de 201 pb.

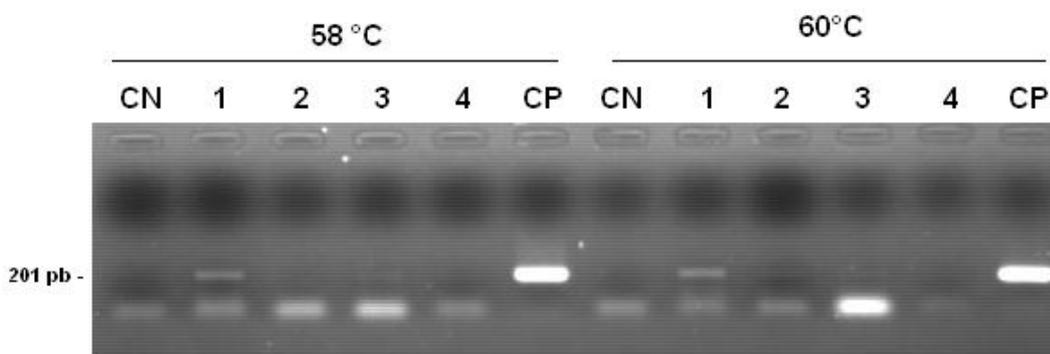


Figura 6. Teste de temperatura de anelamento a 58°C e 60°C. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de UV., CN: controle negativo para CT; 1, 2, 3 e 4: amostras clínicas de industriários, positivas para CT através da análise no COBAS Amplicor; CP: controle positivo da reação de amplificação, na concentração de 30 ng/μL representado por um fragmento de DNA clamidial de 201 pb.

5.2 Determinação da especificidade dos *primers*

A especificidade dos *primers* CTP1 e CTP2 foi testada submetendo-se o DNA de diferentes microrganismos da microbiota normal e patogênica do trato urogenital masculino e DNA humano, à amplificação. A temperatura de anelamento escolhida foi 56°C, porém, após a visualização do produto de PCR em gel de agarose 1,5%, observou-se uma banda inespecífica referente à *C. albicans*. Novo teste foi realizado aumentando-se a temperatura de anelamento para 57°C, com o objetivo de melhorar a estringência da reação, e eliminar a inespecificidade, que foi alcançada com êxito. Os produtos de amplificação após terem sido visualizados em gel de agarose 1,5%, foram fotografados e submetidos à hibridização com sonda homóloga para a seqüência de 201 pb do plasmídio de *C. trachomatis* (Figura 7 A e B).

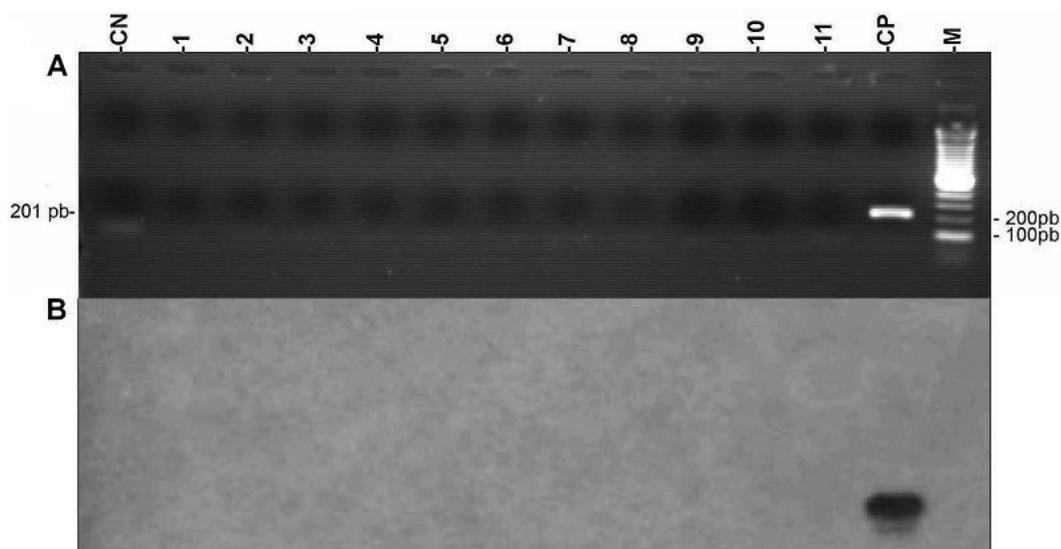


Figura 7. Teste de especificidade dos primers CTP1 e CTP2. A. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de UV. CN: controle negativo da reação; 1: *Escherichia coli*, 2: *Proteus mirabilis*, 3: *Staphylococcus sp* coagulase negativa; 4: *Enterococcus faecalis*; 5: *Candida albicans*; 6: *Staphylococcus aureus*; 7: *Pseudomonas aeruginosa*; 8: HPV alto e baixo risco; 9: *Trichomonas vaginalis*; 10: *Neisseria gonorrhoeae*; 11: DNA humano, CP: *Chlamydia trachomatis* na concentração de 30 ng/μL, M- marcador de tamanho molecular 100 pb (Invitrogen) B. Autoradiografia da hibridização.

5.3 Confirmação da seqüência amplificada

Para se confirmar a seqüência de nucleotídeos do DNA amplificado, foram utilizados dois métodos distintos: clivagem com enzima de restrição e seqüenciamento.

5.3.1 Clivagem enzimática do produto amplificado

Para verificar se a seqüência do fragmento de DNA amplificado com os primers CTP1 e CTP2 era a desejada, foi realizada a clivagem enzimática com

EcoRV que gerou dois fragmentos, um de 130 pb e outro de 71 pb, detectados em gel de agarose a 3%, conforme o esperado através da análise da seqüência (Figura 8).

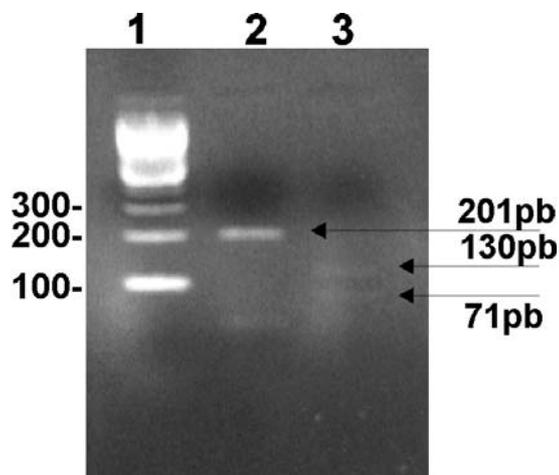


Figura 8. Análise eletroforética do produto de PCR de 201 pb após clivagem com a enzima EcoRV. 1: Marcador de tamanho molecular de 100 pb; 2: produto de PCR não clivado; 3: clivagem do produto de PCR gerando os fragmentos de 130 pb e 71 pb.

5.3.2 Seqüenciamento do produto amplificado

A análise da seqüência de 201 pb por seqüenciamento automático e posterior alinhamento no software BLAST revelou 100% de complementaridade com a seqüência do plasmídio críptico de *C. trachomatis* depositada no GenBank sob número de acesso AE001273 (Figura 9).

201 pb	57	caatctattaagatatctcccaaattggctcaaaatgggatggtagaagttataggtcctt	116
pLGV440	3006	caatctattaagatatctcccaaattggctcaaaatgggatggtagaagttataggtcctt	3065
201 pb	117	gattttctttcatctcattaccatgcattagcagctatccaaagattactgaccgcaacg	176
pLGV440	3066	gattttctttcatctcattaccatgcattagcagctatccaaagattactgaccgcaacg	3125
201 pb	177	aattacaaggggaa	190
pLGV440	3126	aattacaaggggaa	3139

Figura 9. Alinhamento da seqüência de 201 pb. A seqüência obtida através da amplificação por PCR com os *primers* CTP1 e CTP2 foi alinhada com a seqüência depositada no GeneBank do plasmídio LGV440 de *Chlamydia trachomatis* (nº de acesso: AE001273).

5.4 Determinação do limite de detecção do teste

Para determinar o limite de detecção do teste proposto, foi utilizado DNA de *C. trachomatis* extraído conforme descrito na seção 4.5.1 dos Materiais e Métodos. Partindo-se da concentração de 30 ng/μL, foram realizadas 11 diluições seriadas do DNA até 50 fg/μL. Na reação de PCR utilizou-se 1 μL de cada diluição.

O limite de detecção verificado em gel de agarose e também após a hibridização foi de 1 pg/μL. (Figura 10 A e B).

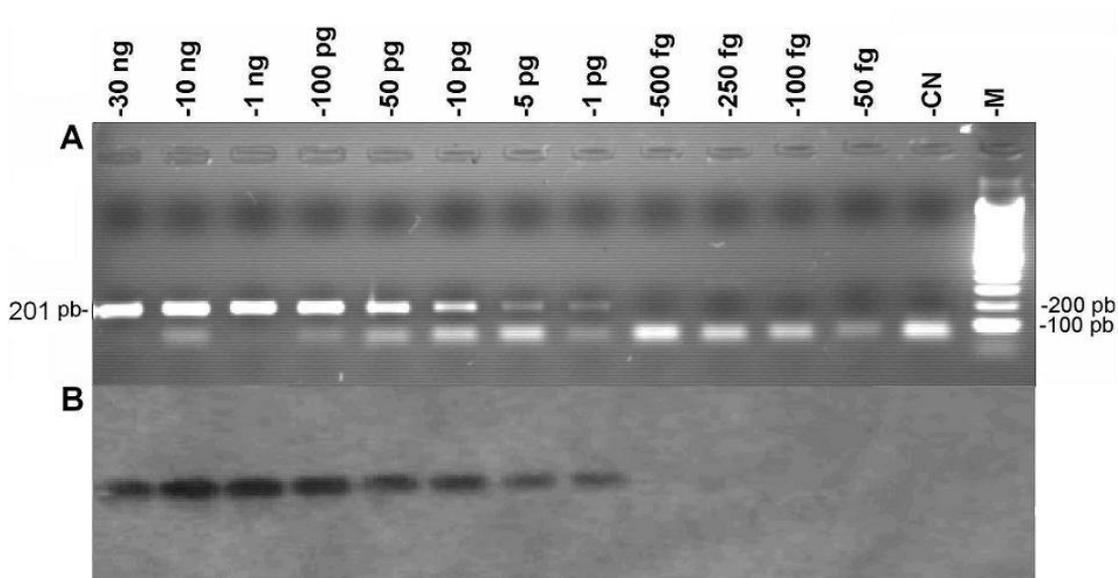


Figura 10. Teste de sensibilidade analítica da PCR. **A.** Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de UV. As canaletas representam as 12 diluições seriadas do DNA clamidial que variaram de 30 ng até 50 fg. CN: controle negativo da reação de PCR; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen). **B.** Autoradiografia da reação de hibridização.

5.5 Análise das amostras clínicas

Foram testadas 111 amostras de urina masculina para *C. trachomatis* pela PCR *in house* que já haviam sido analisadas pelo Sistema Automatizado COBAS Amplicor Roche, onde 37 amostras apresentavam resultado positivo e 74 apresentavam resultado negativo (Tabela 5).

Tabela 5. Amostras clínicas utilizadas no experimento.

Amostras analisadas pelo PCR COBAS Amplicor para CT			
	Positivo	Negativo	Total
Urina masculina	37	74	111

CT: *Chlamydia trachomatis*

5.5.1 Análise das amostras positivas

Das 37 amostras positivas para CT pelo COBAS Amplicor, 28 apresentaram o mesmo resultado pela PCR *in house* após a visualização em gel de agarose e 33 apresentaram resultado positivo somente após hibridização. Das 4 amostras negativas pela PCR *in house*, 2 apresentaram resultado positivo, após nova extração de uma nova alíquota de amostra clínica. Portanto, das 37 amostras positivas pelo COBAS, 35 confirmaram o mesmo resultado pela reação de PCR *in house* (Figura 11 A e B, Figura 12 A e B, Tabela 6).

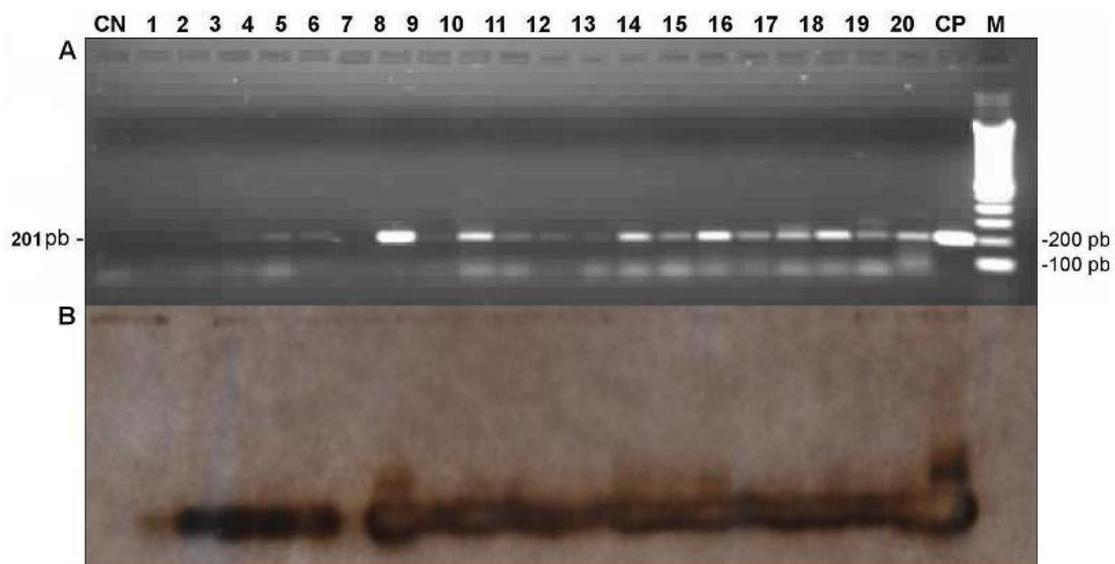


Figura 11. Amostras de urina positivas para *C. trachomatis*. **A.** Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de UV dos produtos de PCR obtidos com os primers CTP1/CTP2. 1 a 8: amostras de industriários, 9 a 20: amostras de pacientes atendidos em clínicas de DST. CN: controle negativo da reação; CP: controle positivo da PCR; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen). **B.** Autoradiografia da reação de hibridização.

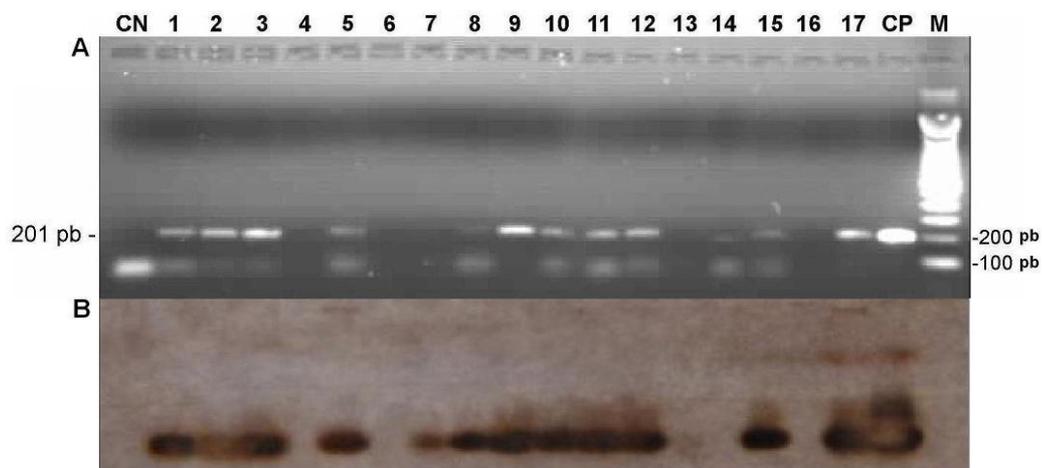


Figura 12. Amostras de urina positivas para *C. trachomatis*. A. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de UV dos produtos de PCR obtidos com os primers CTP1/CTP2. 1 a 17: Amostras de pacientes atendidos em clínicas de DST; CN: controle negativo da PCR; CP: controle positivo da PCR; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen). B. Autoradiografia da reação de hibridização.

Tabela 6. Amostras clínicas positivas para *Chlamydia trachomatis* pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR *in house*

Amostras de urina masculina	Amostras Positivas para <i>Chlamydia trachomatis</i>						
	PCR COBAS Amplicor	PCR <i>in house</i> gel		PCR <i>in house</i> hibridização		Repetição PCR <i>in house</i> hibridização	
	pos.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	Neg.
Industriários	8	5	3	8	0	-	-
DST sem outros agentes infecciosos	12	10	2	12	0	-	-
DST com outros agentes infecciosos	17	13	4	13	4	2	2
Total	37	37		37		4	
Resultados divergentes	-	9		4		2	

DST: doença sexualmente transmissível; PCR: *polymerase chain reaction*; pos: positivo; neg: negativo; Total: número de amostras analisadas ou repetidas; agentes infecciosos: *Neisseria gonorrhoeae* e HPV alto e baixo risco.

5.5.2 Análise das amostras clínicas negativas

Das 74 amostras clínicas testadas que apresentavam resultado negativo para CT pelo COBAS Amplicor, 2 apresentaram resultado positivo pela PCR *in house* após hibridização. Para confirmar se este resultado não poderia ser devido a uma contaminação com produto amplificado, foram selecionadas novas alíquotas das amostras clínicas e todo o procedimento de extração de DNA e amplificação pela PCR *in house* foi repetido. Após este procedimento apenas uma amostra continuou positiva (Figura 13 A e B e Tabela 7).



Figura 13. Amostras de urina negativas para *Chlamydia trachomatis*. A. Análise eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de UV dos produtos de PCR obtidos com os primers CTP1/CTP2. 1 a 16: amostras de urina de pacientes industriários; 17 a 19: amostras de urina de pacientes atendidos em clínicas de DST. CN: controle negativo da reação; CNE: controle negativo da extração; CP: controle positivo da PCR; M: marcador de tamanho molecular de 100 pb (Invitrogen). B. Autoradiografia da reação de hibridização.

Tabela 7. Amostras clínicas negativas para *Chlamydia trachomatis* pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR *in house*

Amostras Negativas para <i>Chlamydia trachomatis</i>							
Amostras de urina masculina	PCR COBAS Amplicor	PCR <i>in house</i> gel		PCR <i>in house</i> hibridização		Repetição PCR <i>in house</i> hibridização	
	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.	pos.	neg.
Industriários	16	0	16	0	16	-	-
DST sem outros agentes infecciosos	29	0	29	0	29	-	-
DST com outros agentes infecciosos	29	0	29	2	27	1	1
Total	74		74		74		2
Resultados divergentes	-	-			2		1

DST: doença sexualmente transmissível; PCR: *polymerase chain reaction*; pos: positivo; neg: negativo; Total: número das amostras analisadas ou repetidas; agentes infecciosos: *Neisseria gonorrhoeae*, HPV alto e baixo risco.

5.5.3 Teste de inibição da PCR *in house*

Para confirmar a inibição da PCR o DNA extraído das amostras de urina foram contaminadas com DNA clamidial (*spiked*) conforme descrito na Seção 4.9.1. Materiais e Métodos. Este procedimento foi realizado para aquelas amostras que apresentaram resultado falso-negativo, quando comparados àqueles resultados encontrados pelo COBAS Amplicor. Também foi utilizado um controle interno na reação, com *primers* que amplificam o gene de β globina do DNA humano, conforme descrito na Seção 4.9.2 dos Materiais e Métodos. Estes dois experimentos foram realizados com o material obtido na primeira extração e confirmado após nova extração das amostras clínicas.

Foram testadas 5 amostras, sendo 4 delas negativas para *C. trachomatis* na visualização em gel e na hibridização e, uma fracamente positiva apenas na hibridização. Na primeira extração observamos uma inibição total da reação de PCR nas amostras 1, 2, 3 e 5, e uma inibição parcial na amostra 4, tanto com o *spiked*, quanto com o controle interno. Porém, a amostra 3 foi fracamente positiva após hibridização. Na segunda extração obtivemos uma inibição parcial nas amostras 1, 2

e 4 com o *spiked* e uma inibição total do controle interno apenas na amostra 1. Após a hibridização as amostras 2, 3 e 5 confirmaram serem positivas para *C. trachomatis* (dados não mostrados).

Observamos, após a segunda extração das amostras, uma diminuição importante da inibição na reação de PCR, onde após hibridização confirmamos a positividade de 2 das 4 amostras negativas e uma forte hibridização na amostra antes, fracamente positiva (Figura 14 A e B). Portanto, através deste experimento foi possível verificar a presença de substâncias inibidoras da PCR *in house*, possivelmente explicando os resultados falso-negativos.

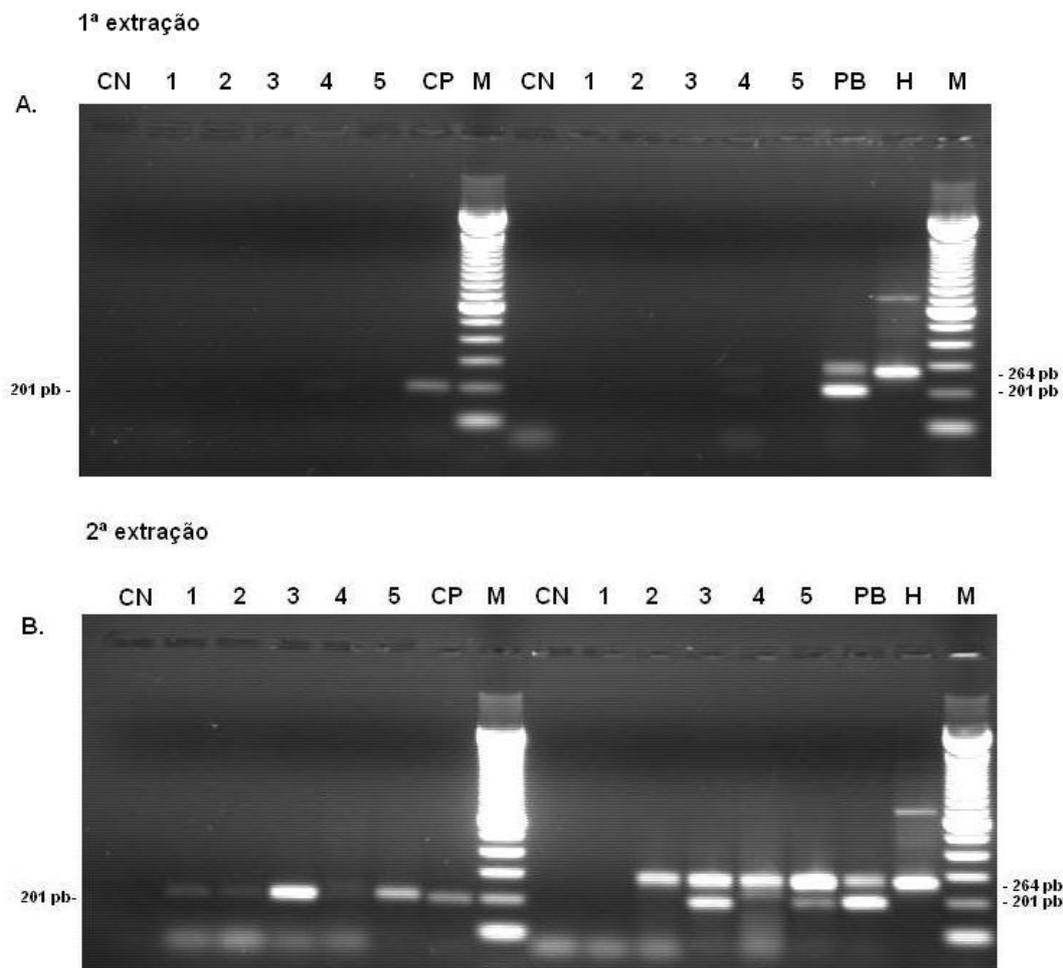


Figura 14 Teste de inibição da PCR *in house*. **A.** Resultado do teste de inibição realizado a partir do produto da 1ª extração de DNA das amostras clínicas. **B.** Resultado do teste de inibição realizado a partir do produto da 2ª extração de DNA das amostras clínicas. CN: controle negativo; amostras 1: 281; 2: 290; 3: 335; 4: 337; 5: 348; CP: 10 pg de DNA *Chlamydia trachomatis*; M: marcador de tamanho molecular 100 pb (Invitrogen); PB: 150 ng de DNA *Chlamydia trachomatis* + 210 ng DNA humano; H:, controle positivo da amplificação por PCR dos *primers* de β -globina realizados a partir de 210 ng DNA humano. A metade esquerda do gel é o teste de inibição com *spike*, a metade direita é o teste de inibição com a β -globina humana.

5.5.4 Análise estatística

A sensibilidade e especificidade da reação de *PCR in house* foram calculadas, comparando os resultados obtidos nesta reação, com aqueles obtidos pelo COBAS Amplicor, que foi considerado o padrão ouro para o diagnóstico de *C. trachomatis*. (Tabelas 8, 9 e 10).

Tabela 8. Cálculo estatístico dos resultados obtidos pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR *in house* com detecção em gel de agarose.

		PCR COBAS- Roche	
		Positivo	Negativo
PCR <i>in house</i> Gel	Positivo	28 a	0 c
	Negativo	9 b	74 d

Cálculo da Sensibilidade: $S = a / a + b$

$S = 75,7\%$ (IC: 59,0 – 86,0)

Cálculo da Especificidade: $E = d / d + c$

$E = 100,0\%$ (IC: 94,0 – 100)

A Tabela 8 representa a análise visual do produto de PCR *in house* em gel de agarose. Das 37 amostras positivas pelo PCR COBAS 9 não demonstraram positividade pela PCR *in house* resultando em uma sensibilidade de 75,7% com intervalo de confiança entre 59,0 e 86,0. Já a especificidade foi de 100%, pois todas as 74 amostras negativas pelo PCR COBAS apresentaram os mesmos resultados na PCR *in house*, com um intervalo de confiança entre 94,0 e 100.

Tabela 9. Cálculo estatístico dos resultados obtidos pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR *in house* com detecção após hibridização.

		PCR COBAS-Roche			
		Positivo		Negativo	
PCR <i>in house</i> Hibridização	Positivo	33	a	2	c
	Negativo	4	b	72	d

Cálculo da Sensibilidade: $S = a / a + b$

$S = 89,2\%$ (IC: 75,3 – 95,7)

Cálculo da Especificidade: $E = d / d + c$

$E = 97,3\%$ (IC: 90,7 – 99,3)

A Tabela 9 representa a análise do produto de PCR *in house* após hibridização. Das 37 amostras positivas pelo PCR COBAS, 4 não demonstraram positividade pela PCR *in house* após hibridização, resultando em uma sensibilidade de 89,2% com intervalo de confiança entre 75,3 e 95,7. Já a especificidade foi de 97,3%, pois das 74 amostras negativas pelo PCR COBAS 2 deram resultados positivos na PCR *in house* após hibridização, com um intervalo de confiança entre 90,7 e 99,3.

Tabela 10. Cálculo estatístico dos resultados obtidos pelo PCR COBAS Amplicor versus PCR *in house* após repetição das amostras que apresentaram resultados divergentes.

PCR COBAS- Roche

		Positivo	Negativo
PCR <i>in house</i> Repetição	Positivo	35 a	1 c
	Negativo	2 b	73 d

Cálculo da Sensibilidade: $S = a / a + b$

$S = 94,6\%$ (IC: 82,0 – 98,0)

Cálculo da Especificidade: $E = d / d + c$

$E = 98,6\%$ (IC: 93,0 – 100)

A Tabela 10 representa a análise do produto de PCR *in house* após hibridização e os resultados da repetição das amostras divergentes. Das 37 amostras positivas pelo PCR COBAS, 2 não demonstraram positividade pela PCR *in house* após repetição, resultando em uma sensibilidade de 94,6% com intervalo de confiança entre 82,0 e 98,0. Já a especificidade foi de 98,6%, pois das 74 amostras negativas pelo PCR COBAS 1 apresentou resultado positivo na PCR *in house* após repetição, com um intervalo de confiança entre 93,0 e 100.

5.5.4.1 Expressão gráfica da relação entre sensibilidade e especificidade

A curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) foi construída plotando-se a taxa de verdadeiro-positivos (sensibilidade) contra a taxa de falso-positivos (especificidade). Testes de bom poder discriminatório concentram-se no canto superior esquerdo da curva ROC e testes de menor poder discriminatório têm curvas mais próximas à diagonal que vai da esquerda inferior à direita superior. A acurácia global do teste pode ser descrita como a área sob a curva ROC. Quanto maior a área, melhor o teste. A acurácia da PCR *in house* após hibridização e após repetição da reação, foi demonstrada graficamente nas Figuras 15 e 16, apresentando o bom poder discriminatório do teste.

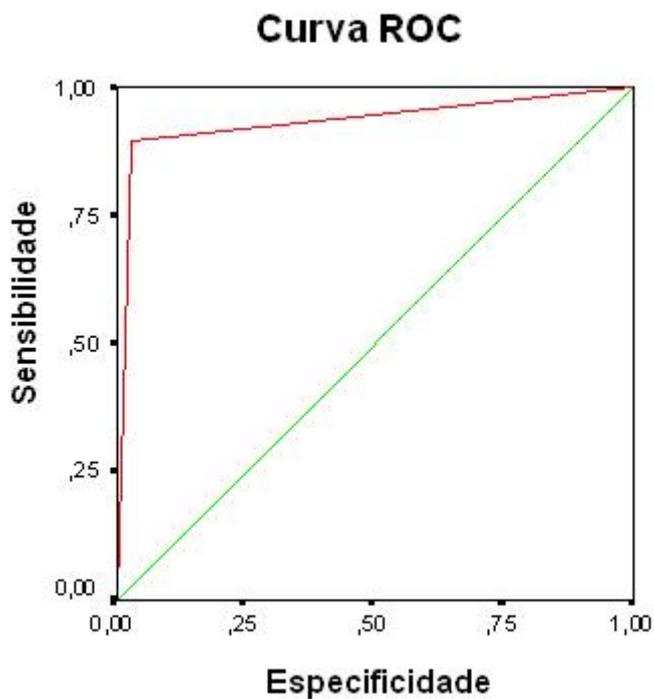


Figura 15. Acurácia da PCR *in house* após hibridização. A acurácia é observada na área sob a curva ROC até a linha de base na diagonal.

Cálculo da acurácia: $A = \text{resultados corretos} / \text{total resultados} \times 100$

$A = 94,6\%$

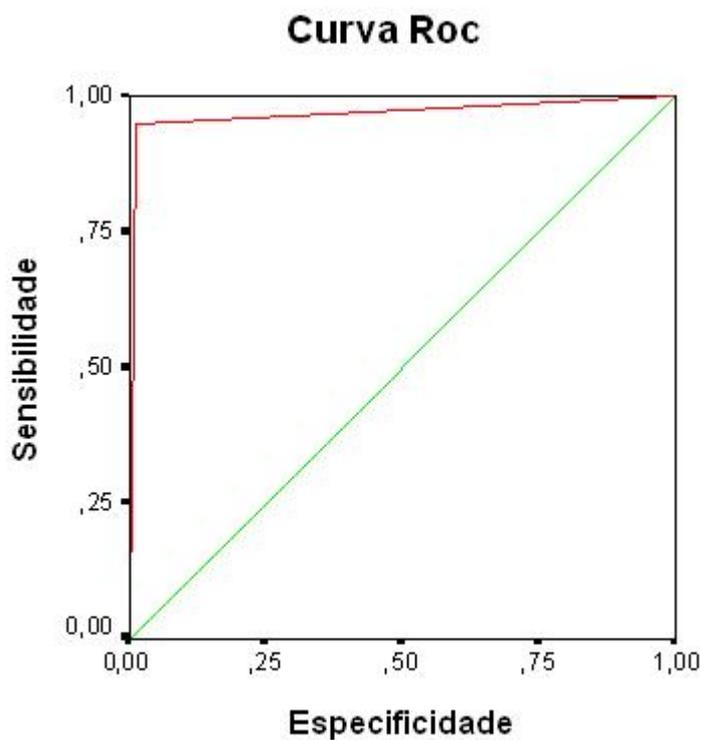


Figura 16. Acurácia da PCR *in house* após nova extração. A acurácia é observada na área sob a curva ROC até a linha de base na diagonal.

Cálculo da acurácia: $A = \text{resultados corretos} / \text{total resultados} \times 100$

$A = 97,3\%$

Nas 29 amostras clínicas positivas para *C. trachomatis* provenientes de pacientes de clínica de DST, foram observados outros microrganismos, citados na Tabela 11. Na Tabela 12 representamos os resultados de todas as amostra urinárias utilizadas nesse estudo.

Tabela 11. Outros microrganismos associados à *C. trachomatis*.

Microrganismo	Resultado	Número	%
<i>N. gonorrhoeae</i>	Positivo	13	44,8
	Negativo	16	55,2
HPV Alto risco	Positivo	6	20,7
	Negativo	23	79,3
HPV Baixo risco	Positivo	4	13,8
	Negativo	25	86,2

Tabela 12. Análises individuais das amostras de urina do estudo.

Nº amostra	PCR COBAS CT	PCR-gel CT	PCR-Hibridização CT	Repetição CT	Neisseria gonorrhoeae	HPV alto risco	HPV baixo risco
Ind. 05	Pos	Neg	Pos	X	Neg	X	X
Ind. 12	Pos	Neg	Pos	X	Neg	X	X
Ind. 94	Pos	Pos	Pos	X	Neg	X	X
Ind. 118	Pos	Pos	Pos	X	Neg	X	X
Ind. 172	Pos	Pos	Pos	X	Neg	X	X
Ind. 211	Pos	Neg	Pos fraco	X	Neg	X	X
Ind. 226	Pos	Pos	Pos	X	Neg	X	X
Ind. 230	Pos	Pos	Pos	X	Neg	X	X
DST 214	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 215	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 221	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 238	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 243	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Pos
DST 246	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Pos	Neg
DST 251	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 253	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Neg	Neg
DST 254	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Neg	Neg
DST 258	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Pos	Pos
DST 261	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Neg	Neg
DST 263	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Neg	Neg
DST 264	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Neg	Neg
DST 266	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 270	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Pos	Neg
DST 281	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
DST 286	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 290	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg
DST 291	Pos	Neg	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 306	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Neg	Neg
DST 312	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Neg	Pos
DST 317	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 320	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
DST 331	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Pos	Pos
DST 335	Pos	Neg	Pos fraco	Pos	Neg	Neg	Neg
DST 337	Pos	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Neg
DST 341	Pos	Pos	Pos	X	Pos	Neg	Neg
DST 348	Pos	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg
DST 350	Pos	Pos	Pos	X	Neg	Neg	Neg
Ind. 112	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 115	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 120	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 128	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 129	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 138	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 155	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X

Nº amostra	PCR COBAS CT	PCR-gel CT	PCR-Hibridização CT	Repetição CT	Neisseria gonorrhoeae	HPV alto risco	HPV baixo risco
Ind. 159	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 163	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 164	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 167	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 176	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 177	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 179	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 181	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
Ind. 183	Neg	Neg	Neg	X	Neg	X	X
DST 219	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 229	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 233	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 237	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 250	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 255	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 268	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 271	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 274	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 275	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 276	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 278	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 279	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 282	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 285	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 287	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 289	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 292	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 293	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 295	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 304	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 310	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 314	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 315	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 316	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 318	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 329	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 333	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 345	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Neg
DST 212	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Pos	Neg
DST 216	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 217	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos
DST 220	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos
DST 224	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Pos	Pos
DST 225	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Pos	Pos
DST 226	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos
DST 227	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Pos	Pos

Nº amostra	PCR COBAS CT	PCR-gel CT	PCR-Hibridização CT	Repetição CT	Neisseria gonorrhoeae	HPV alto risco	HPV baixo risco
DST 239	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 240	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 244	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos
DST 247	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 249	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos
DST 252	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Pos	Pos
DST 256	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos
DST 257	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 230	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 259	Neg	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Neg
DST 262	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos	Neg	Neg
DST 267	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Pos	Neg
DST 269	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos
DST 277	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 296	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 301	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 303	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 305	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos
DST 307	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Pos	Pos
DST 308	Neg	Neg	Neg	X	Pos	Neg	Neg
DST 309	Neg	Neg	Neg	X	Neg	Neg	Pos

Ind., industriários; DST, clínica de doenças sexualmente transmissíveis; CT, *Chlamydia trachomatis*; X, amostra não testada; Neg, reação negativa; Pos, reação positiva; *Neisseria gonorrhoeae* foi pesquisada na mesma amostra de urina pelo COBAS Amplicor e HPV alto e baixo risco foi processado por captura híbrida, *kit* da DIGENE, em raspado prepucial dos pacientes de clínica de DST.

6 Discussão

As doenças sexualmente transmissíveis apresentam-se historicamente como o maior desafio para o diagnóstico através de testes laboratoriais, pela dificuldade de obtenção das amostras clínicas, muitas vezes de forma invasiva e dolorosa ou pela dificuldade do cultivo por serem agentes altamente fastidiosos como a *C. trachomatis*. Porém, com o desenvolvimento dos testes de amplificação de ácidos nucleicos para a maioria dos agentes causadores das DST, eliminou-se a necessidade do cultivo bacteriano permitindo um diagnóstico acurado usando amostras colhidas por métodos não invasivos ou menos invasivos, como urina e conteúdo vaginal (Blake & Morse, 2000; Schachter *et al.*, 2005).

A tecnologia utilizada como referência no presente estudo, foi o primeiro teste de amplificação de ácidos nucleicos desenvolvido com fins comerciais, o Amplicor PCR da Roche. Atualmente já existe formato automatizado com um controle interno de DNA para detectar a presença de inibidores nas amostras clínicas, (COBAS). Tanto urina masculina e feminina quanto *swabs* uretrais e endocervicais, são materiais biológicos já aprovados pelo FDA americano, para o diagnóstico de *C. trachomatis* pelo Sistema COBAS Amplicor, Roche (Blake & Morse, 2000). Apenas os testes de amplificação de ácidos nucleicos têm sido efetivos para o diagnóstico de *C. trachomatis* em amostras não invasivas, devido a sua maior sensibilidade e ao número insuficiente de antígenos ou organismos viáveis passíveis de serem detectados por EIE ou cultura (Jascek *et al.*, 1993; Mahony *et al.*, 2003). Além disso, os NAAT comerciais apresentam-se melhor padronizados do que os métodos culturais (Black *et al.*, 2002).

Urina é o material biológico de escolha para o diagnóstico de *C. trachomatis* por PCR em homens sintomáticos e assintomáticos. A sensibilidade de detecção clamidial em urina masculina pode ser 20% superior à da cultura uretral. PCR de *swab* uretral de pacientes assintomáticos pode apresentar inibição em até 45% das amostras testadas, assim como os *swabs* de pacientes sintomáticos. Principalmente os

pacientes co-infectados com *N. gonorrhoeae*, apresentam uma sensibilidade de detecção clamidial mais baixa por PCR (Toye *et al.*, 1998; Airell *et al.*, 2000; Van Der Pol *et al.*, 2000; Sugunendran *et al.*, 2001).

Urina de mulheres demonstrou apresentarem duas vezes mais inibidores do que as masculinas e como a *C. trachomatis* é encontrada com mais freqüência na região endocervical, a urina não deve ser utilizada sozinha para o diagnóstico. Porém, como 10% a 23% das mulheres apresentam apenas infecção uretral é aconselhável a coleta do *swab* endocervical ou vaginal mais a urina, para aumentar a sensibilidade de detecção do teste (Quinn *et al.*, 1996; Morré *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2000; Airell *et al.*, 2000; Joyee *et al.*, 2003).

Acredita-se que a inibição parcial ou total da PCR em mulheres possa ocorrer devido ao hormônio beta-gonadotrofina coriônica (β -HCG), uso de anticoncepcionais, presença de metais em dispositivos intra-uterinos e cristais que contenham cátions divalentes, particularmente íons de magnésio que apresentam efeito inibidor significativo na atividade da *Taq* polimerase (Chan *et al.*, 2000; Airell *et al.*, 2000). Segundo Airell e colaboradores (2000), os inibidores de PCR estão presentes predominantemente em urina e na camada superficial da mucosa uretral de mulheres jovens; porém, inibição é detectada tanto em amostras urinárias de mulheres como de homens, e em raspados uretrais masculino, feminino e secreção endocervical (Verkooyen *et al.*, 1996; Toye *et al.*, 1998; Vincelette *et al.*, 1999; Chong *et al.*, 2003; Joyee *et al.*, 2003; Tan & Chan, 2005).

As amostras de urina testadas neste trabalho foram extraídas de um estudo maior, processado no Sistema COBAS Amplicor, onde a prevalência de *C. trachomatis* em homens assintomáticos (industriários) alcançou 3,4%, e 21% nos pacientes sintomáticos atendidos em clínica de DST. Esses dados são equiparados aos da literatura. Black & Morse (1997) demonstraram que a prevalência de *C. trachomatis* em homens atendidos em clínica da DST seria de 15 a 20% e Gaydos & Rompalo (2002) descreveram uma prevalência de 2,8 a 5,5% em homens assintomáticos.

Das 37 amostras testadas positivas para *C. trachomatis* pelo COBAS AmpliCor, 33 foram confirmadas positivas pela PCR *in house* e 4 amostras de pacientes com sintomas de DST apresentaram resultados falso negativos. A sensibilidade clínica do teste foi calculada em 89,2%. Uma vez que o controle positivo da mistura de PCR amplificou, ficou constatado o bom funcionamento da reação, restando pesquisar a presença de substâncias endógenas inibidoras da PCR, comuns em amostras urinárias.

Vários estudos têm observado que amostras inicialmente falsamente negativas para a presença do DNA de *C. trachomatis* tornam-se positivas após estocagem e repetição do teste, pois os inibidores presentes nas amostras clínicas podem lentamente sofrer inativação com o tempo de estocagem, sendo sensíveis tanto a baixas quanto a altas temperaturas. O congelamento e descongelamento das amostras pode destruir moléculas inibitórias lábeis ou liberar alvos adicionais de moléculas de DNA rompendo as células bacterianas mais eficientemente, assim como pode atuar diretamente em proteínas induzindo uma mudança conformacional e subsequente perda da atividade inibitória. O aquecimento das amostras entre 95°C e 100°C por 10 minutos tem sido utilizado com relativa eficácia, para inativação de inibidores (Loeffelholz *et al.*, 1992; Skulnick *et al.*, 1994; Chernesky *et al.*, 1996; Toye *et al.*, 1998; Mahony *et al.*, 1998; Airell *et al.*, 2000; Barbeyrac *et al.*, 2000; Van Doornum *et al.*, 2001; Van Der Pol *et al.*, 2001).

Dois testes foram realizados para confirmar a presença de inibidores nestas 4 amostras falso-negativas, a amplificação das amostras contaminadas com o DNA clamidial em uma concentração próxima ao limite de detecção do teste (*spiked*) e a adição de um controle interno de amplificação do gene da beta-globina humana.

Na primeira extração do DNA destas 4 amostras observou-se inibição total em 3 amostras (281, 290 e 348) e inibição parcial em 1 (337). Apesar da pequena amostragem do estudo, a inibição encontrada foi de 10,8%. Novas alíquotas foram re-extraídas e o nível de inibição caiu para 5,4%, mesmo índice de inibição encontrado por Van Der Pol e colaboradores (2000) em pacientes com sintomas de DST testados para *C. trachomatis*. Duas amostras positivaram na repetição do teste

(290, 348), elevando a sensibilidade clínica de detecção para 94,6%. A sensibilidade de 94,6% do atual experimento foi superior a 92,9%, média das sensibilidades encontradas em PCR de urina masculina para detecção de *C. trachomatis* em diversas publicações, citadas na Tabela 4.

O congelamento e descongelamento das amostras clínicas provavelmente tenham eliminado 50% dos inibidores da reação, conforme demonstrado por Airell e colaboradores (2000), porém 2 amostras (281 e 337) ainda permaneceram negativas.

Este nível de inibição não era o esperado, pois durante a extração do DNA das amostras clínicas, além do detergente guanidina foi adicionada uma segunda etapa de purificação com fenol-clorofórmio e precipitação com etanol visando reduzir a presença de inibidores na reação de PCR. Autores como Toyee e colaboradores (1998), Mahony e colaboradores (1998), Blake & Morse (2000), Betsou e colaboradores (2003), observaram uma efetividade na eliminação de inibidores na ordem de 99% a 100%, após extração com fenol-clorofórmio, o que não ocorreu no atual experimento. Por isso é aconselhável que cada laboratório teste o nível de inibidores na sua população de pacientes, pois talvez existam diferenças regionais na inibição da reação (Toye *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 1999).

A diluição 1/10 de amostras clínicas ajuda na eliminação de 89% dos inibidores, porém pode interferir na sensibilidade do teste quando as amostras apresentarem baixa concentração de DNA clamidial. Por este motivo a diluição não foi efetuada neste estudo, mas eventualmente poderá ser incorporada a um estudo futuro (Toye, *et al.*, 1998; Mahony *et al.*, 1998; Pasternack, *et al.*, 1999; Airell *et al.*, 2000).

Observou-se que as 4 amostras com inibidores apresentavam associação com *N. gonorrhoeae* e 2 destes pacientes também apresentavam infecção pelo HPV alto risco (Tabela 12). Encontramos co-infecção com *N. gonorrhoeae* em 44,8% das amostras positivas para *C. trachomatis*, um número bem superior a 27,1% encontrado por Van Der Pol e colaboradores (2000). Esta publicação também reportou uma diminuição de sensibilidade na PCR em *swab* uretral de pacientes co-infectados com *N. gonorrhoeae*.

O volume de urina coletada não foi determinado em nosso experimento, porém segundo Moncada e colaboradores (2003), este pode afetar a performance do teste, pois um volume muito pequeno pode favorecer uma maior concentração de inibidores e um volume maior, pode diluir o DNA alvo quando estiver presente em poucas cópias. Thomas e colaboradores (1995) demonstraram que 40% de pacientes homens e mulheres atendidos em clínicas de DST apresentavam menos 10 corpos elementares clamidiais por amostra clínica, segundo os autores, um desafio para a sensibilidade da PCR. Entretanto, Betsou e colaboradores (2003) estimaram que 5 pg do DNA clamidial equivalem a 3 corpos elementares. No presente experimento o limite de detecção da PCR *in house* foi de 1 pg do DNA clamidial, o equivalente a 0,6 do corpo elementar, pois o plasmídeo clamidial alvo da reação, se apresenta em múltiplas cópias, aumentando a sensibilidade de detecção da bactéria pela PCR (Mahony *et al.*, 1993). Portanto, o fato de 2 amostras permanecerem negativas, estaria mais associado a inibidores residuais na reação, do que ao limite de detecção do teste *in house*. Resultados falso-negativos poderiam também estar relacionados à perda do DNA clamidial no sedimento urinário por mau processamento técnico da amostra (Blake *et al.*, 2002; Schachter *et al.*, 2003).

Das 74 amostras clínicas testadas negativas para *C. trachomatis* pelo COBAS Amplicor, 72 foram confirmadas negativas pela PCR *in house* e 2 amostras apresentaram resultados falso positivos. A especificidade clínica do teste foi calculada em 97,3%.

As 2 amostras pertenciam a pacientes sintomáticos atendidos em clínica de DST, ambos apresentando associação positiva com *N. gonorrhoeae* (Tabela 12). Na primeira extração de DNA utilizado na PCR *in house*, as amostras 259 e 262 só positivaram após hibridização e a amostra 259 apresentou baixo conteúdo de DNA na membrana. Após extração de DNA de nova alíquota e re-teste, apenas a amostra 262 permaneceu positiva, resultando em uma especificidade clínica final para a reação, de 98,6%. A especificidade da PCR *in house* apresentou um valor bem próximo a 99,0%, que foi a média das especificidades encontrada nos testes de PCR

para detecção de *C. trachomatis* em urina masculina em diversas publicações citadas na Tabela 4 da Introdução.

Resultados falso-positivos pela PCR *in house* normalmente são atribuídos à contaminação por produtos de PCR, denominados PCR-*carryover*. Esse ácido nucléico contaminante pode ser encontrado em todas as superfícies do laboratório (Toye *et al.*, 1996; Verlengia *et al.*, 2000).

Apesar de sempre se ter utilizado controle negativo e positivo nas etapas de extração e amplificação do DNA, luvas, ambientes isolados e descontaminados, capela de fluxo laminar, ponteiras com barreira protetora para pipetagem do material clínico, soluções autoclavadas e reagentes alíquotados conforme recomendação de Kwok & Higuchi (1989), resultados falso-positivos e falso-negativos sempre poderão ocorrer em etapas manuais de pré-tratamento e processamento da amostra clínica (Verkooyen *et al.*, 2003), e a alta sensibilidade dos NAAT também pode aumentar o risco de resultados falso-positivos (McAdam, 2000).

A especificidade da PCR COBAS Amplicor tem sido considerada elevada, por prevenir a contaminação da reação com o uso da uracil-N-Glicosilase (AmpErase), que inativa qualquer amplificação prévia do DNA presente como *carryover* numa nova amostra a ser testada (Toye *et al.*, 1996). Entretanto, Berg e colaboradores (2005) demonstraram a existência de resultado falso-negativo pela PCR Amplicor. O controle interno da reação revela eficientemente inibição na PCR, porém, sob certas condições como a remoção insuficiente de inibidores da urina e pouca quantidade de patógenos, pode ocorrer uma inibição seletiva da amplificação do alvo clamidial com uma amplificação preferencial do controle interno.

A possibilidade de resultado falso-negativo para detecção de *C. trachomatis* pelo COBAS Amplicor devido à inibição seletiva gerou o questionamento se o resultado da amostra 262 era realmente um falso-positivo, uma vez que a amostra confirmou positividade pela PCR *in house* em duas alíquotas da urina e pertencia a um paciente com sintomas de DST, inclusive infectado com *N. gonorrhoeae*. Como vimos anteriormente a co-infecção com *N. gonorrhoeae* pode contribuir para a diminuição da sensibilidade da PCR. Neste caso, a correlação clínica também

poderia ser usada como um determinante do real estado de doença do paciente (McAdam, 2000).

Uma amplificação inespecífica seria pouco provável, pois o fragmento de DNA amplificado na PCR *in house* foi seqüenciado e revelou uma complementaridade de 100% com a seqüência do plasmídeo LGV440 de *C. trachomatis* depositada no GenBank (Figura 9). Além disto, para o teste de especificidade analítica da reação *in house* com os *primers* CTP1 e CTP2, foram escolhidos os microrganismos isolados com mais freqüência em infecções bacterianas ascendentes do trato urinário, microbiota da uretra e os patógenos sexualmente transmissíveis mais comuns. Infecções urinárias em pacientes ambulatoriais são causadas principalmente por bacilos gram-negativos como *E. coli* em 80% dos casos, *Ps. mirabilis* em 6%, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Serratia* sp e *P. aeruginosa* em 4% dos casos. Entre as bactérias gram-positivas os *Staphylococcus* sp coagulase negativa ocorrem em 7% dos casos e outros microrganismos como *S. epidermidis*, *S. aureus* e *E. faecalis*, perfazem 3% dos casos. *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* e *Ureaplasma urealiticum* são as bactérias mais freqüentes causadoras de uretrite (Murray *et al.* 1999). Outros agentes capazes de causar infecção no trato urinário são *Candida* spp e *T. vaginalis*, já o HPV (Papillomavirus humano) pode ser encontrado no meato uretral e na cavidade prepucial (Mandell *et al.*, 2005).

Os microrganismos escolhidos para serem testados foram: *E. coli*, *Ps. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Staphylococcus* sp coagulase negativa, *E. faecalis*, *N. gonorrhoeae*, *C. albicans*, *T. vaginalis* e HPV (alto e baixo risco). Com exceção de *N. gonorrhoeae*, HPV, e *T. vaginalis*, as bactérias foram diluídas em urina testada negativa para *C. trachomatis*, simulando uma infecção urinária. A verificação foi realizada após cultura quantitativa, onde a presença de mais de 100.000 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de urina é altamente indicativo de infecção (Baron *et al.*, 1994), e pela coloração de Gram, onde a observação em imersão de um ou mais microrganismo por campo em esfregaço preparado com 10 µL de urina não centrifugada, se correlaciona bem com um crescimento bacteriano maior ou igual a 100.000 UFC/mL, apresentando uma

sensibilidade de 94% e uma especificidade de 90% (Kass, 1956 apud Murray *et al.*, 1999; Washington, 1981 apud Koneman *et al.*, 1997). Todos estes microrganismos foram submetidos à PCR *in house* sem apresentarem amplificação, conforme o esperado.

A utilização de testes moleculares para diagnosticar doenças infecciosas é sempre um desafio para os laboratórios, pois a padronização e o controle de qualidade embora extremamente críticos ainda não existem em toda sua amplitude para os materiais e equipamentos em uso no mercado (Madej, 2001). Além disso, um controle interno para testes por PCR tem sido proposto pelo Comitê de Padronização Europeu (CEN) em colaboração com a Organização Internacional de Padronização (ISO), visando à implementação dos programas de qualidade (Hoorfar *et al.*, 2004). O controle interno é uma forma de monitorar e garantir a confiabilidade dos resultados negativos para *C. trachomatis* maximizando a sensibilidade do teste diagnóstico (Toye *et al.*, 1998; Mahony *et al.*, 1998; Airell *et al.*, 2000, Betsou *et al.*, 2003).

O presente estudo demonstrou a necessidade real da utilização de um controle interno na PCR *in house*, cujo custo adicional corresponde apenas ao do reagente, pois a carga de trabalho permanece a mesma. Para redução de custos, o controle interno pode ser colocado apenas em amostras já testadas negativas previamente, porém, com um aumento potencial de tempo para a liberação do laudo pela repetição das amostras (Vincelette *et al.*, 1999).

Os NAATs comerciais apresentam custos proibitivos para muitos programas de saúde pública, apesar deles terem se mostrado como custo efetivo na prevenção do gasto com as seqüelas clamidiais. Como uma alternativa mais econômica, a técnica de *pool* de amostras urinárias, cervicais e vaginais têm se mostrado altamente sensível e específica. Uma unidade de *pool* pode conter de 4 a 10 amostras, mas algumas publicações sugerem que um *pool* com 5 amostras, chega a alcançar 100% de sensibilidade e especificidade. Se o ensaio testado for negativo, todas as amostras são consideradas negativas, caso seja positivo resulta no re-teste das amostras individualmente, para se determinar quais são as positivas. Em populações de baixa

prevalência a técnica pode apresentar uma economia de 59% dos testes, já em populações de alta prevalência os *pools* pequenos são mais custo efetivos (Kacena *et al.*, 1998; Chan *et al.*, 2000; Martin, 2000; Morré *et al.*, 2000; Gaydos & Rompalo, 2002; Joyee *et al.*, 2003; Currie *et al.*, 2004; Tan & Chan, 2005).

Pool pode ser de valor estratégico para estudos epidemiológicos em locais com poucos recursos financeiros, assim como uma ferramenta molecular para validação do manejo sindrômico. Em países desenvolvidos onde existem programas de controle da *C. trachomatis*, a prevalência tem caído aumentando o custo da triagem, surgindo uma boa alternativa para o uso do *pool*. Porém, sua adoção na rotina laboratorial do setor privado é improvável, pois os kits comerciais não incluem protocolos com instruções para o uso de *pool*; além disso, em população de baixa prevalência esta técnica poderá produzir resultados falso negativos devido ao baixo número de microrganismos ou pelo efeito de inibidores presentes em uma ou mais amostras (Peeling *et al.*, 1998; Black & Morse, 2000; Cook & Ostergaard, 2003).

O uso de *pool* de amostras clínicas proporciona economia com reagentes e trabalho sem comprometer a sensibilidade e especificidade do teste, favorecendo a implementação de NAAT em laboratórios que usam testes menos sensíveis. Entre as desvantagens do uso desta técnica podemos citar a necessidade de padronização, uma maior manipulação das amostras e o aumento do tempo de liberação do laudo pela repetição das amostras de *pool* positivo (www.ucsf.edu/castd/std_publications.html).

Embora os maiores problemas da doença clamidial como doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, infertilidade e dor pélvica crônica afetem mulheres, os homens servem de reservatórios que mantêm a transmissão e re-infecção das parceiras sexuais. Devido ao alto nível de re-infecções em mulheres e a alta prevalência em homens assintomáticos é improvável um controle significativo da epidemia clamidial sem a triagem de homens e mulheres em populações de alto risco, aumentando o interesse da saúde pública em triagens como medida preventiva (Cheng *et al.*, 2001; Gaydos & Rompalo, 2002).

Há uma boa evidência mostrando que o tratamento de homens pode erradicar a infecção clamidial e no Canadá já existe a recomendação da CTFPHC (*Canadian*

Task Force on Preventive Health Care), para a triagem de todos os membros de grupos de alto risco (USPSTF, 2001).

A importância do diagnóstico de *C. trachomatis* em homens nos motivou a padronizar esta técnica de PCR *in house*.

7 Conclusões

Segundo Battle e colaboradores (2001), os principais problemas que envolvem a não adesão ao uso dos NAATs em laboratório clínico estão relacionados com o alto custo, pela limitação da área física, pela complexidade ou pelo pequeno volume de exames solicitados. Porém, 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, devido à baixa sensibilidade dos métodos tradicionalmente empregados.

O Laboratório Central do Estado (LACEN-RS) disponibiliza uma grande área física para o diagnóstico molecular, com equipamentos modernos e recursos humanos treinados. O alto custo dos kits comerciais para detecção de *C. trachomatis* é um fator complicador para a adesão deste serviço ao diagnóstico molecular comercial. Entretanto, o método de PCR proposto neste estudo para a detecção de *C. trachomatis* é uma técnica de baixo custo para a implementação imediata em laboratórios da rede pública, em pequenas rotinas. A análise comparativa com outra metodologia molecular durante a fase de padronização, demonstrou haver boa concordância entre os resultados, confirmando uma acurácia de 97,5%, próxima do padrão ouro que é em torno de 100%.

Apesar deste estudo ter sido feito com um número pequeno de amostras, 37 positivas e 74 negativas, onde o ideal para verificação de um novo teste seria 50 positivas e 100 negativas, não haverá necessidade de ampliar a amostragem, pois a diferença de sensibilidade e especificidade entre o método proposto e o de referência, foi menor que 5%. Nos experimentos de Verkooyen e colaboradores (2003) o COBAS Amplicor apresentou uma sensibilidade em torno de 97% e uma especificidade entre 99% e 100% e a PCR *in house* 94,6% de sensibilidade e 98,6% de especificidade.

Este teste foi primariamente desenvolvido para fins diagnóstico, mas segundo as normas do CUMITECH 31 (*Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology*) (1997) um teste que alcança uma sensibilidade clínica próxima a 95%

e uma especificidade superior a 98%, poderá ser usado também para *triagem* e como teste confirmatório.

O primeiro estudo colaborativo internacional de controle de qualidade para o diagnóstico de *C. trachomatis* por NAAT, com a participação de 96 laboratórios, comparou a performance dos diversos métodos comerciais e *in house* utilizados pelos participantes. O grupo que utilizou testes de PCR *in house* foi o que apresentou menor escore de resultados corretos (88,6%), mostrando que resultados obtidos por PCR *in house* devem ser interpretados com cuidado. Este estudo reforçou a necessidade do uso de reagentes de referência e padronização dos procedimentos operacionais, assim como a implementação do controle de qualidade para os métodos de amplificação dos ácidos nucleicos (Verkooyen *et al.*, 2003).

A implementação da PCR *in house* em uma grande rotina, no entanto, deve ser observada com reservas, pois é uma técnica que consome tempo, sendo processada em várias etapas, e sem detecção automatizada. A hibridização dos produtos de PCR com sonda homóloga trouxe um incremento na sensibilidade de detecção da técnica *in house*. A etapa de hibridização é recomendada para compor o teste proposto, porém esta é uma técnica extremamente laboriosa e demorada, dificultando sua adequação na rotina de diagnóstico laboratorial.

Uma alternativa para implantar esta técnica *in house* de forma mais rápida e econômica, seria suprimir a etapa de hibridização. Segundo este estudo, na observação do produto de PCR em gel de agarose dos pacientes assintomáticos (industriários) observou-se uma sensibilidade de 62,5%, sugerindo pouca quantidade de DNA clamidial, por estarem inseridos em um grupo de baixa prevalência. Já em pacientes sintomáticos (DST) foi encontrada uma sensibilidade de 82,8%, o equivalente a um nível de detecção de 10-100 corpos elementares clamidiais (Tabela 3). Caso esta opção seja a escolhida, deve ser aplicada apenas aos pacientes sintomáticos, por apresentarem um número maior de DNA alvo, e sempre na presença de um controle interno da reação, para detectar inibidores que poderiam comprometer ainda mais a sensibilidade do teste.

Para rotinas maiores a padronização de detecção colorimétrica em microplacas ou por *dot blot* dos híbridos formados (utilizando *primers* biotinilados), com enzimas como a estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina, seria uma opção a ser considerada (Sperhacker *et al.*, 2003). O mesmo deve ser seguido para a verificação do teste para detecção de *C. trachomatis* em urina de mulheres.

Com os devidos ajustes nas etapas de extração do DNA e de detecção do produto de PCR, a implementação deste teste na rotina laboratorial pode ser de grande utilidade para o diagnóstico de *C. trachomatis*, assim como para a triagem de grupos de risco, favorecendo o estudo de prevalência da infecção clamidial no estado.

Como o Laboratório Central de Saúde Pública já foi contemplado com um equipamento para se fazer a PCR em tempo real, o ideal será investir em uma tecnologia nova, que utiliza sondas de hibridização fluorescentes e elimina toda a etapa pós-amplificação. Esta tecnologia segundo Eickhoff e colaboradores (2003), tem se mostrado eficiente e confiável para o diagnóstico precoce da infecção por *C. trachomatis*, permitindo identificação rápida da bactéria em diversos tipos de amostras clínicas. Todo o processo ocorre em duas horas e apresenta um controle interno integrado ao sistema que detecta resultado falso-negativo e condições errôneas da reação de amplificação.

Esta é uma excelente oportunidade para a implantação de uma tecnologia de detecção clamidial altamente sensível e específica, restando agora a análise de custos. Devemos ter em mente que a prevenção é sempre mais custo-efetivo do que o tratamento de uma doença já instalada, pois as seqüelas físicas e emocionais podem implementar um custo intangível adicional, principalmente quando o agente bacteriano em questão é considerado um facilitador da propagação do HIV e da implantação do câncer do colo uterino.

8 Perspectivas

Tendo em vista os resultados obtidos, as perspectivas para o diagnóstico molecular de *C. trachomatis* são:

- 1 – Reavaliar a técnica de extração e purificação do DNA da amostra clínica, procurando reduzir o tempo e otimizar resultados.
- 2 – Detectar a presença de substâncias inibidoras da reação de PCR, na população estudada.
- 3 - Submeter amostras de urina feminina ao protocolo padronizado.
- 4 - Escolher um controle interno para a reação.
- 5 - Padronizar um protocolo de detecção de *C. trachomatis* por PCR em tempo real, para amostras de urina masculina e feminina, incluindo *pool* de amostras clínicas.

9 Referências Bibliográficas

- Airell, A., Ottoson, L., Bygdeman, S. M., Carlberg, H., Lidbrink, P., Rudén, A. K. & Elfgren, K. (2000).** *Chlamydia trachomatis* PCR (Cobas Amplicor) in Women: endocervical specimen transported in a specimen of urine versus endocervical and urethral specimens in 2-SP medium versus urine specimens only. *International Journal of STD & AIDS* **11**, 651-658.
- Alary, M., Poulin, C., Bouchard, C., Fortier, M., Murray, G., Gingras, S., Aubé, M. & Morin, C. (2001).** Evaluation of a Modified Sanitary Napkin as a Sample Self-Collection Device for the Detection of Genital Chlamydial Infection in Women. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2508-2512.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2004).** *Biologia Molecular da Célula*. Edited by Artmed. Porto Alegre.
- Barbeyrac, B., Géniaux, M., Hocké, C., Dupon, M. & Bébéar, C. (2000).** Detection of *Chlamydia trachomatis* in symptomatic and asymptomatic populations with urogenital specimens by AMP CT (Gen-Probe Incorporated) compared to others commercially available amplification assays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **37**, 181-185.
- Baron, E. J., Peterson, L. R. & Finegold, S. M. (1994).** *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 9 edn.
- Battle, T. J., Golden, M. R., Suchland, K. L., Counts, J. M., Hughes, J. P., Stamm, W. E. & Holmes, K. K. (2001).** Evaluation of Laboratory Testing Methods for *Chlamydia trachomatis* Infection in the Era of Nucleic Acid Amplification. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 2924-2927.
- Belland, R. J., Scidmore, M. A., Crane, D. D., Hogan, D. M., Whitmire, W., McClarty, G. & Caldwell, H. D. (2001).** *Chlamydia trachomatis* cytotoxicity associated with complete and partial cytotoxin genes. *PNAS* **98**, 13984-13989.
- Berg, E. S., Storvold, G., Anestad, G., Moi, H. & Skaug, K. (2005).** Reability of the Amplicor internal control to disclose false-negative *Chlamydia trachomatis* PCR results. *Journal of Microbiological Methods* **60**, 125-129.
- Betsou, F., Beaumont, K., Sueur, J. M. & Orfila, J. (2003).** Construction and Evaluation of Internal Control DNA for PCR Application of *Chlamydia trachomatis* DNA from Urine Samples. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1274-1276.
- Black, C., M. (1997).** Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 160-184.

Black, C. & Morse, S. (2000). The Use of Molecular Techniques for the Diagnosis and Epidemiologic Study of Sexually Transmitted Infections. *Current Infectious Disease Reports*, 31-43.

Black, C. M., Marrazo, J., Johnson, R. E., Hook III, E. W., Jones, R. B., Green, T. A., Schachter, J., Stamm, W. E., Bolan, G., St. Louis, M. E. & Martin, D. H. (2002). Head-to-Head Multicenter Comparison of DNA Probe and Nucleic Acid Amplification Tests for *Chlamydia trachomatis* Infection in Women Performed with an Improved Reference Standard. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3757-3763.

Brunelle, B. W., Nicholson, T. L. & Stephens, R. S. (2004). Microarray-based genomic surveying of gene polymorphisms in *Chlamydia trachomatis*. *Genome Biology* **5**, R:42.

CDC (2002). Screening Tests to Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections. *Morbidity and Mortality Week Report* **51**, 1-38.

Chan, E. L., Brandt, K., Antonishyn, N. & Horsman, G. B. (1999). Minimal inhibitory effect of male urine on detection of *Chlamydia trachomatis* by Roche Amplicor PCR. *J. Med. Microbiol.* **48**, 215-218.

Chan, E. L., Brandt, K., Stoneham, H., Antonishyn, N. & Hosman, G. B. (2000). Comparison of the effectiveness of Polymerase Chain Reaction and Enzyme Immunoassay in Detecting *Chlamydia trachomatis* in Different Female Genitourinary Specimens. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 840-843.

Chan, E. L., Brandt, K., Olien, K., Antonishyn, N. & Horsman, G. B. (2000). Performance Characteristics of the Becton Dickinson ProbeTec System for Direct Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Male and Female Urine Specimens in Comparison With the Roche Cobas System. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 1649-1652.

Cheng, H., Macaluso, M., Vermund, S. H. & Hook III, E. W. (2001). Relative Accuracy of Nucleic Acid Amplification Tests and Culture in Detecting *Chlamydia* in Asymptomatic Men. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3927-3937.

Chernesky, M. A., Chong, S., Jang, D., Luinstra, K., Sellors, J. & Mahony, J. B. (1997). Ability of Commercial Ligase Chain Reaction and PCR Assays To Diagnose *Chlamydia trachomatis* Infections in Men by Testing First-Void Urine. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 982-984.

Chernesky, M. A., Jang, D., Sellors, J., Luinstra, K., Chong, S., Castriciano, S. & Mahony, J. B. (1996). Urinary inhibitors of polymerase chain reaction and testing of multiple specimens may contribute to lower assay sensitivities for diagnosing

Chlamydia trachomatis infected women. *Molecular and cellular Probes* **11**, 243-249.

Chernesky, M. A., Martin, D. H., Hook, E. W., Willis, D., Jordan, J., Wang, S., Lane, J. R., Fuller, D. & Schachter, J. (2005). Ability of New APTIMA CT and APTIMA GC Assays To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria Gonorrhoeae* in Male Urine and Urethral Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 127-131.

Chomezynski, P., Mackey, K., Drews, R. & Wilfinger, W. (1997). Dnazol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* **22**, 550-553.

Chong, S., Jang, D., Song, X., Mahony, J., Petrich, A., Barriga, P. & Chernesky, M. (2003). Specimen Processing and Concentration of *Chlamydia trachomatis* Added Can Influence False-Negative Rates in the LCx Assay but Not in the APTIMA Combo 2 Assay When Testing for Inhibitors. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 778-782.

Cook, R. L. & Ostergaard, L. (2003). Current Issues in Screening for *Chlamydia trachomatis*. *Current Infectious Disease Reports* **5**, 153-158.

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

Currie, M. J., McNiven, M., Yee, T., Schiemer, U. & Bowden, F. J. (2004). Pooling of Clinical Specimens Prior to Testing for *Chlamydia trachomatis* by PCR Is Accurate and Cost Saving. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 4866-4867.

Davis, C. H., Raulston, J. E. & P.B., W. (2002). Protein disulfide isomerase, a component of the estrogen receptor complex, is associated with *Chlamydia trachomatis* serovar E attached to human endometrial epithelial cells. *Infect Immun* **70**, 3413-3418.

Dean, D. & Powers, V. C. (2001). Persistent *Chlamydia trachomatis* infections resist apoptotic stimuli. *Infect Immun* **69**, 2442-2447.

Eickhoff, M., Laue, T., Ruckes, T., Cramer, S. O., Krupp, G. & Tiemann, C. (2003). 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.

Elder, B. L., Hansen, S. A., Kellogg, J. A., Marsik, F. J. & Zabranski, R. J. (1997). Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. In *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology - 31*, pp. 1-18. Washington: ASM Press.

Everett, K., D. E., Bush, R. M. & Andersen, A. A. (1999). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **49**, 415-440.

Farencena, A., Comanducci, M., Donati, M., Ratti, G. & Cevenini, R. (1997). Characterization of A New Isolate of *Chlamydia trachomatis* With Lacks the Common Plasmid and Has Properties of Biovar trachoma. *Infection and Immunity* **65**, 2965-2969.

Fields, K., A. & Hackstadt, T. (2002). The Chlamydial Inclusion: Escape from the Endocytic Pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 221-245.

Fletcher, R. H., Fletcher, S. W. & Wagner, E. H. (1996). *Epidemiologia Clínica: Elementos essenciais*, 3 edn. Porto Alegre-RS: Artes Médicas.

Francisco, W. (2001). Gonococcias e Clamídias. In *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. Rio de Janeiro: Guanabara Hoogan.

Gaydos, C. A. & Rompalo, A. M. (2002). The Use of Urine and Self-obtained Vaginal Swabs for the Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases. *Current Infectious Disease Reports* **4**, 148-157.

Gaydos, C. A., Howell, M. R., Quinn, T. C., Gaydos, J. C. & Mc Kee, K. T. J. (1998). Use of ligase chain reaction with urine versus cervical culture for detection of *Chlamydia trachomatis* in an asymptomatic military population of pregnant and nonpregnant females attending Papanicolaou smears clinics. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1300-1304.

Gaydos, C. A., Theodore, M., Dalesio, N., Wood, B. J. & Quinn, T. C. (2004). Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 3041-3045.

Gaydos, C. A., Quinn, T. C., Willis, D., Weissfeld, A., Hook, E. W., Martin, D. H., Ferrero, D. V. & Schachter, J. (2003). Performance of the APTIMA Combo 2 Assay for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Female Urine and Endocervical Swab Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 304-309.

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

Goessens, W. H. F., Mouton, J. W., van der Meiden, W. I., Deelen, S., van Rijsoort-Vos, T. H., Toom, N. L., Verbrugh, H. A. & Verkooyen, R. P. (1997). Comparison of Three Commercially Available Amplification Assays, AMP CT, LCx, and COBAS AMPLICOR, for Detection of *Chlamydia trachomatis* in First-Void Urine. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 2628-2633.

Griffais, R. & Thibon, M. (1989). Detection of *Chlamydia trachomatis* by the Polymerase Chain Reaction. *Res. Microbiol.*, 139-141.

Hogan, R., J., Matheus, S. A., Mukhopadhyay, S., Summersgill, J. T. & Timms, P. (2004). Chlamydial Persistence: beyond the Biphasic Paradigm. *Infection and Immunity* **72**, 1843-1855.

Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M. & Fach, P. (2004). Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 1863-1868.

<http://www.berkeley.edu:4231/index.html> (2005).Chlamydia.

<http://www.cdc.gov/std> (2005).Chlamydia Prevalence Monitoring Project Annual Report 2002: Department of Health and Human Services- CDC.

http://www.chlamydiae.com/docs/biology/biol_apop.asp (2005).Chlamydial induction and prevention of host cell apoptosis.

<http://www.chlamydiae.com/docs/biology/biol/genomics> (2005).Chlamydial genomics.

http://www.chlamydiae.com/docs/biology/genome_plasmid.asp (2005).Chlamydial plasmids.

http://www.chlamydiae.com/docs/biology/impathol_intro.asp (2005).Introduction to the immunopathology of chlamydial infections.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html> (2005).

<http://www.who.int/docstore/hiv/GRSTI/003.htm> (2005).Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: World Health Organization Department of HIV/AIDS.

Jaschek, G., Gaydos, C. A., Welsh, L. E. & Quinn, T. (1993). Direct Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens from Symptomatic and Asymptomatic Men by Using a Rapid Polymerase Chain Reaction Assay. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 1209-1212.

Johnson, R. E., Green, T. A., Schachter, J., Jones, R. B., Hook III, E. W., Black, C. M., Martin, D. H., St. Louis, M. E. & Stamm, W. E. (2000). Evaluation of Nucleic Acid Amplification Tests as Reference Tests for *Chlamydia trachomatis* Infections in Asymptomatic Men. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 4382-4386.

Jones, R. B. (1995). *Chlamydia trachomatis* (Trachoma, Perinatal Infections, Lymphogranuloma Venereum, and Other Genital Infections). In *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, pp. 1676-1693. New York: Churchill Livingstone Inc.

Joyee, G. A., Thyagarajan, P. S., Rajendran, P., Sowmya, B., Venkatesan, C. & Ganapathy, M. (2003). 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.

Kacena, K. A., Quinn, S. B., Howell, M. R., Madico, G. E., Quinn, T. C. & Gaydos, C. A. (1998). Pooling Urine Samples for Ligase Chain Reaction Screening for Genital *Chlamydia trachomatis* Infection in Asymptomatic Women. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 481-485.

Kleba, B. J., Banta, E., Lindquist, E. A. & Stephens, R. S. (2002). Recruitment of Mammalian Cell Fibronectin to the Surface of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* **70**, 3935-3938.

Konemann, E. B., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. & Tenover, W. J. W. (1997). *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5 edn. Philadelphia.

Kwok, S. & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. In *Nature*, pp. 237-238.

Lan, J., Walboomers, J. M. M., Roosendaal, R., Van Doornum, G. J. J., MacLaren, D. M., Meijer, C. J. M. L. & Van Den Brule, A. J. C. (1993). 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* **31**, 1060-1065.

Loeffelholz, M. J., Lewinski, C. A., Silver, S. R., Purohit, A. P., Herman, S. A., Buonagurio, D. A. & Dragon, E. A. (1992). Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Specimens by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2847-2851.

Macleod, J., Salisbury, C., Low, N., McCarthy, A., Sterne, J. A. C., Holloway, A., Patel, R., Sanford, E., Morcom, A., Horner, P., Smith, J. D., Skidmore, S., Herring, A., Caul, O., Hobbs, R. F. D. & Egger, M. (2005). Coverage and Uptake of Systematic postal screening for genital *Chlamydia trachomatis* and prevalence of

infection in the United Kingdom general population: cross sectional study. *BMJ* **330**, 940.

Madej, R. (2001). Using Standards and Controls in Molecular Assays for Infectious Diseases. *Molecular Diagnosis* **6**, 335-345.

Mahon, C. R. & Manuselis Jr., G. (1995). *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia.

Mahony, J. B., Coombes, B. K. & Chernesky, M. A. (2003). *Chlamydia and Chlamydophila*. In *Manual of Clinical Microbiology*, pp. 991-1004. Washington, D. C.: ASM Press.

Mahony, J. B., Luinstra, K. E., Sellors, J. W. & Chernesky, M. A. (1993). Comparison of Plasmid and Chromosome - Based Polymerase Chain Reaction Assays for Detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 1753-1758.

Mahony, J., Chong, S., Jang, D., Luinstra, K., Faught, M., Dalby, D., Sellors, J. & Chernesky, M. (1998). Urine Specimens from Pregnant and Nonpregnant Women Inhibitory to Amplification of *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acid by PCR, Ligase Chain Reaction, and Transcription - Mediated Amplification: Identification of Urinary Substances Associated with Inhibition and Removal of Inhibitory Activity. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3122-3126.

Mardh, P. A. (2004). Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. *Current Opinion in Infectious Diseases* **17**, 49-52.

Martin, D. H. (2000). Preventing *Chlamydia trachomatis* Infections: A Changing Paradigm. *Current Infectious Disease Reports* **2**, 7-9.

Martin, D. H., Nsuami, M., Schachter, J., Hook III, E. W., Ferrero, D., Quinn, T. C. & Gaydos, C. A. (2004). Use of Multiple Nucleic Acid Amplification Tests To Define the Infected-Patient "Gold Stand" in Clinical Trial of New Diagnostic Tests for *Chlamydia trachomatis* Infections. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 4749-4758.

McAdam, A. J. (2000). Discrepant Analysis: How Can We Test a Test? *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 2027-2029.

McCartney, R. A., Walker, J. & Scoular, A. (2001). Detection of *Chlamydia trachomatis* in genitourinary medicine clinic attendees: comparison of strand displacement amplification and the ligase chain reaction. *British Journal of Biomedical Science* **58**, 235-238.

Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelin, D. & William, R. (1999). *Microbiologia Médica*, 2 edn. São Paulo.

Miranda, A. E., Szwarcwald, C. L., Peres, R. L. & Page-Shafer, K. (2004). Prevalence and Risk Behaviors for *Chlamydial* Infection in a Population- Based of Female Adolescents in Brazil. *Sexually Transmitted Diseases* **31**, 542-546.

Miyashita, N., Matsumoto, A., Fukano, H., Niki, Y. & Matsushima, T. (2001). The 7.5-Kb common plasmid is unrelated to the drug susceptibility of *Chlamydia trachomatis*. *J. Infect Chemother*, 113-116.

Molano, M., Meijer, C. J. L. M., Morr , S. A., Pol, R. & van den Brule, A. J. C. (2004). Combination of PCR Targeting the VD2 of *omp1* and Reverse Line Blot Analysis for Typing of Urogenital *Chlamydia trachomatis* Serovars in Cervical Scrape Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 2935-2939.

Moncada, J. (2002).Chlamydia Laboratory Procedures: To Pool or Not To Pool: www.ucsf.edu/castd/std_publications.html.

Moncada, J., Chow, J. M. & Schachter, J. (2003). Volume Effect on Sensitivity of Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens from Females. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 4842-4843.

Morr , S. A., van Valkengoed, I. G. M., Moes, R. M., Boeke, A. J. P., Meijer, C. J. L. M. & Van Den Brule, A. J. C. (1999). Determination of *Chlamydia trachomatis* Prevalence in an Asymptomatic Screening Population: Performances of the LCx and COBAS Amplicor Tests with Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 3092-3096.

Morr , S., van Valkengoed, I. G. M., Jong, A., Boeke, A. J. P., van Eijk, J. T. M., Meijer, C. J. L. M. & Van Den Brule, A. J. C. (1999). Maild, Home-Obtained Urine Specimens: a Reliable Screening Approach for Detecting Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* Infections. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 976-980.

Morr , S. A., Meijer, C. J. L. M., Munk, C., Kr ger-Kjaer, S., Winter, J. F., Jorgensens, H. O. & Van Den Brule, A. J. C. (2000). Pooling of Urine Specimens for Detection of Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* Infections by PCR in a Low-Prevalence Population: Cost-Saving Strategy for Epidemiological Studies and Screening Programs. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1679-1680.

Morrison, R. P. (2003). New insights into a persistent problem - chlamydial infections. *J. Clin. Invest.* **111**, 1647-1649.

Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C. & Tenover, R. H. (1999). *Manual of Clinical Microbiology*, 7 edn. Washington DC: American Society for Microbiology.

Nolte, F. S. & Caliendo, A. M. (2003). Molecular Detection and Identification of Microorganisms. In *Manual of Clinical Microbiology*, pp. 234-256. Washington, D.C.: ASM Press.

Pasternack, R., Vuorinen, P. & Miettinen, A. (1999). Comparison of a Transcription-Mediated Amplification Assay and Polymerase Chain Reaction for Detection of *Chlamydia trachomatis* in First-Void Urine. *Eur J Microbiol Infect Dis* **18**, 142-144.

Pasternack, R., Vuorinen, P., Pitkälä, T., Koskela, M. & Miettinen, A. (1997). Comparison of Manual Amplicor PCR, Cobas Amplicor PCR, and LCx Assay for Detection of *Chlamydia trachomatis* Infection in Women by Using Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 402-405.

Peeling, R. W., Toye, B., Jessamine, P. & Gemmill, I. (1998). Pooling of urine specimens for PCR testing: a cost saving strategy for *Chlamydia trachomatis* control programmes. *Sex Transm. Infect.* **74**, 66-70.

Puolakkainen, M., Hiltunen-Back, E., Reunala, T., Suhonen, S., Lähteenmäki, P., Lehtinen, M. & Paavonen, J. (1998). Comparison of Performances of Two Commercially Available Tests, a PCR Assay and a Ligase Chain Reaction Test, in Detection of Urogenital *Chlamydia trachomatis* Infection. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 1489-1493.

Quinn, T. C., Welsh, L., Lentz, A., Crotchfelt, K., Zenilman, J., Newhall, J. & Gaydos, C. (1996). Diagnosis by AMPLICOR PCR of *Chlamydia trachomatis* Infection in Urine Samples from Women and Men Attending Sexually Transmitted Disease Clinics. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1401-1406.

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

Ramos, M. C., Becker, D., Perin, M. T., Malheiro, A. D., Ritter, A. T., Girão, N. & Cestari, T. (2002). 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**, 47.

Roche (1999). Reação em cadeia da Polimerase - PCR: Roche.

Rodrigues, V. F. S., Mello, F. C. Q., Ribeiro, M. O., Fonseca, L., Kritski, A. L., Rossetti, M. L. & Zaha, A. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* in Blood Samples of Patients with AIDS by Using PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 2297-2299.

Sachse, K., Hotzel, H., Slickers, P., Ellinger, T. & Ehricht, R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila* spp. *Molecular and cellular Probes* **19**, 41-50.

Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 3 edn. NY: Cold Spring Harbor.

Santos, C., Teixeira, F., Vicente, A. & Astolfi-Filho, S. (2003). Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **7**, 91-95.

Schachter, J. & Stamm, W. E. (1999). Chlamydia. In *Manual of Clinical Microbiology*, pp. 795-808. Washington, D.C.: ASM Press.

Schachter, J., Hook III, E. W., Martin, D. H., Willis, D., Fine, P., Fuller, D., Jordan, J., Janda, W. M. & Chernesky, M. (2005). Confirming Positive Results of Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) for *Chlamydia trachomatis*: All NAATs Are Not Created Equal. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 1372-1373.

Schachter, J., McComack, W. M., Chernesky, M. A., Martin, D. H., van der Pol, B., Rice, P. A., Hook III, E. W., Stamm, W. E., Quinn, T. C. & Chow, J. (2003). Vaginal Swabs Are Appropriate Specimens for Diagnosis of Genital Tract Infection with *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3784-3789.

Schepetiuk, S., Kok, T., Martin, L., Waddell, R. & Higgins, G. (1997). Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Samples by Nucleic Acid Tests: Comparison with Culture and Enzyme Immunoassay of Genital Swab Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **35**, 3355-3357.

Seadi, C. M. F. (2002). Deteccion de *Chlamydia trachomatis* por la técnica de PCR em muestras clinicas. León: Universidad León-España.

Semeniuk, H., Zentner, A., Read, R. & Church, D. (2002). Evaluation of sequential testing strategies using non-amplified and amplified methods for detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical and urine specimens from women. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **42**, 43-51.

Shafer, M., Moncada, J., Boyer, C. B., Betsinger, K., Flinn, S. D. & Schachter, J. (2003). Comparing First-Void Urine Specimens, Self-Collected Vaginal Swabs, and Endocervical Specimens To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by a Nucleic Acid Amplification Test. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 4395-4399.

Shi, G., Wen, S. Y., Chen, S. H. & Wang, S. Q. (2005). Fabrication and optimization of the multiplex PCR-based oligonucleotide microarray for detection of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Journal of Microbiological Methods* **62**, 245-256.

Show, A. C., Christiansen, G., Roepstorff, P. & Birkelund, S. (2000). Genetic differences in the *Chlamydia trachomatis* tryptophan synthase alpha-subunit can explain variations in serovar pathogenesis. *Microbes Infect.* **2**, 581-592.

Silins, I., Ryd, W., Strand, A., Wadell, G., Tornberg, S., Hansson, B. G., Wang, X., Arnheim, L., Dahl, V., Bremell, D., Persson, K., Dillner, J. & Rylander, E. (2005). *Chlamydia trachomatis* infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* **116**, 110-115.

Skipp, P., Robinson, J., O'connor, C. D. & Clarke, I. N. (2005). Shotgun Proteomic Analysis of *Clamydia trachomatis*. *Proteomics* **5**, 1558-1573.

Skulnick, M., Chua, R., Simor, A. E., Low, D. E., Khosid, H. E., Fraser, S., Lyons, E., Legere, E. A. & Kiching, D. A. (1994). Use of the Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Chlamydia trachomatis* from Endocervical and Urine Specimens in an Asymptomatic Low-Prevalence Population of Women. *Diagn Microbiol and Infect Dis* **20**, 195-201.

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

Stamm, W. E. (1999). *Chlamydia trachomatis* Infections: Progress and Problems. *JID* **179**, S380-S383.

Stamm, W. E., Jones, R. B. & Batteiger, B. E. (2005). *Chlamydia trachomatis* (Trachoma, Perinatal Infections, Lymphogranuloma Venereum, and Others Genital Infections). In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, pp. 2239-2255. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone.

Stamm, W. E., Jones, R. B. & Batteiger, B. E. (2005). Introduction to Chlamydial Diseases. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, pp. 2236-2238. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone.

- Stary, A. (1999).** Correct samples for diagnostic tests in sexually transmitted diseases: which sample for which test? *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **24**, 455-459.
- Stenner-Liewen, F., Liewen, H., Zapata, J. M., Pawlowski, K., Godzik, A. & Reed, J. C. (2002).** CADD, a *Chlamydia* Protein That Interacts with Death Receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 9633-9636.
- Stephens, R. S., Fawaz, F. S., Kennedy, K. A., Koshiyama, K., Nichols, B., Van Ooij, C. & Engel, J. N. (2000).** Eukaryotic Cell Uptake of Heparin-Coated Microspheres: a Model of Host Cell Invasion by *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* **68**, 1080-1085.
- Stephens, R. S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R. L., Zhao, Q., Kooning, E. V. & Davis, R. W. (1998).** Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* **282**, 754-759.
- Stothard, D. R., Toth, G. A. & Batteiger, B. (2003).** Polimorphic Membrane Protein H Has Evolved in Parallel with the Three Disease-Causing Groups of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity* **71**, 1200-1208.
- Strasinger, S. K. (1991).** *Uroanálise e Fluidos Biológicos*, 2 edn. São Paulo.
- Strauss, S., Sastry, P., Sonnex, C., Edwards, S. & Gray, J. (2002).** Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses. *Sex Transm. Infect.* **78**, 135-138.
- Sugunendran, H., Birley, H. D. L., Mallinson, H., Abbott, M. & Tong, C. Y. W. (2001).** Comparison of urine, first and second endourethral swabs for PCR based detection of genital *Chlamydia trachomatis* infection in male patients. *Sex Transm. Infect.* **77**, 423-426.
- Swan, D. C., Tucker, R. A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M. F., Wideroff, L., Unger, E. R., Nisenbaum, R. A., Reeves, W. C. & Icenogle, J. P. (1999).** Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1030-1034.
- Tan, H. H. & Chan, R. (2005).** Use of polymerase chain reaction on pooled cervical swabs to detect *Chlamydia trachomatis* infections in female sex workers in Singapore. *Singapore Med J* **46**, 215-218.
- Tan, H. H., Chan, R. K., Teo, A. S. & Boey, L. P. (1999).** Use of ligase chain reaction and PCR on urine specimens to detect *Chlamydia trachomatis* infections in

a sexually transmitted disease clinic in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* **28**, 245-251.

Thomas, B. J., MacLeod, E. J. & Taylor-Robinson, D. (1995). Evaluation of a Commercial Chain Reaction Assay for *Chlamydia trachomatis* and Suggestions for Improving Sensitivity. *Eur J Microbiol Infect Dis* **14**, 719-723.

Thomas, N. S., Lusher, M., Storey, C. C. & Clarke, I. N. (1997). Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology*, 1847-1854.

Toye, B., Woods, W., Bobrowska, M. & K., R. (1998). Inhibition of PCR in Genital and Urine Specimens Submitted for *Chlamydia trachomatis* Testing. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2356-2358.

Toye, B., Peeling, R. W., Jessamine, P., Claman, P. & Gemmill, I. (1996). Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections in Asymptomatic Men and Women by PCR Assay. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 1396-1400.

USPSTF (2001). Screening for Chlamydial Infection-Recommendations and Rationale. U.S. Preventive Services Task Force. *Am J Prev Med* **20**.

Van Der Pol, B., Quinn, T. C., Gaydos, C. A., Crotchfelt, K., Schachter, J., Moncada, J., Jungkind, D., Martin, D. H., Turner, B., Peyton, C. & Jones, R. B. (2000). Multicenter Evaluation of the AMPLICOR and Automated COBAS AMPLICOR CT/NG Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1105-1112.

Van Der Pol, B., Ferrero, D. V., Buck-Barrington, L., Hook III, E., Lenderman, C., Quinn, T., Gaydos, C. A., Lovchik, J., Schachter, J., Moncada, J., Hall, G., Tuohy, M. J. & Jones, R. B. (2001). Multicenter Evaluation of the BDProbeTec ET System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Urine Specimens, Female Endocervical Swabs, and Male Urethral Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 1008-1016.

Van Doornum, G. J. J., Schouls, L. M., Pijl, A., Cairo, I., Buimer, M. & Bruisten, S. (2001). Comparison between the LCx Probe System and COBAS AMPLICOR System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections in Patients Attending a Clinic for Treatment of Sexually Transmitted Diseases in Amsterdam, the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 829-835.

Verkooyen, R. P., Luijendijk, A., Huisman, W. M., Goessens, W. H. F., Kluytmans, J. A., van Rijsoort-Vos, J. H. & Verbrugh, H. A. (1996). Detection of PCR inhibitors in cervical specimens by using the Amplicor *Chlamydia trachomatis* assay. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 3072-3074.

Verkooyen, R. P., Noordhoek, G. T., Kappler, P. E., Reid, J., Schirm, J., Cleator, G. M., Ieven, M. & Hoddevik, G. (2003). Reability of Nucleic Acid Amplification Methods for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine: Results of the First International Collaborative Quality Control Study among 96 Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3013-3016.

Verlengia, R., Hirata, R. D. C. & Hirata, M. H. (2000). Prevenção e Controle da Contaminação nas Reações de Amplificação de Ácidos Nucleicos. In *Newslab*, pp. 69-80.

Vickerman, P., Watts, C., Alary, M., Mabey, D. & Peeling, R. W. (2003). Sensitivity requirements for the point of care diagnosis of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Women. *Sex Transm. Infect.* **79**, 363-368.

Vincelette, J., Schirm, J., Bogard, M., Bourgault, A. M., Luijt, D. S., Bianchi, A., van Voorst Vader, P. C., Butcher, A. & Rosenstraus, M. (1999). Multicenter Evaluation of the Fully Automated COBAS AMPLICOR PCR Test for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urogenital Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 74-80.

Wang, C., Tang, J., Geisler, W. M., Crowley-Nowick, P. A., Wilson, C. M. & Kaslow, R. A. (2005). Human Leucocyte Antigen and Cytokine Gene Variants as Predictors of Recurrent *Chlamydia trachomatis* Infection in High-Risk Adolescents. *J Infect Dis* **191**, 1084-1092.

Warford, A., Chernesky, M. & Peterson, E. M. (1999). Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology*, 2-18.

Wittwer, C. & Kusukawa, N. (2003). Real-Time PCR. In *Molecular Microbiology-Diagnostic Principles and Practice*, pp. 71-84. Washington: ASM Press.

Young, H., Moyes, A., Horn, K., Scott, G. R., Patizio, C. & Sutherland, S. (1998). PCR testing of genital and urine specimens compared with culture for the diagnosis of clamidial infections in men and women. *Int. J. STD and AIDS* **9**, 661-665.

10 Anexos

10.1 Soluções e Tampões

-Solução de desnaturação

NaCl 1,5 M

NaOH 0,5 M

-Solução de neutralização

NaCl 1,5 M

Tris HCl 1,0 M

pH 7,5

-Solução de transferência

SSC 10x

-SSC 20x

NaCl 3 M

Na Citrato 0,3 M

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 de reação 10x

Tris HCl 10 mM (pH 8,3)

KCl 50 mM

Gelatina 0,1% (W/V)

-Tampão TEB (Tris-borato-EDTA) 1x

Tris HCl 890 mM

EDTA 2,5 mM

Ácido Bórico 890 mM

Ph 8,2

10.2 Manuscrito

REDAÇÃO CIENTÍFICA – Set/2005**Evaluation of Diagnostic Accuracy of an in house PCR Method for *Chlamydia trachomatis* Infection in Urine Specimens of Men Compared to one Commercially Available Amplification Assay.**

Alzira Resende do Carmo Aquino¹; Daniela Becker^{1,2}; Naíla do Nascimento¹; Shana de Souto Weber¹; Fernando Hayashi Sant'Anna¹; Maria Lúcia Rosa Rossetti^{1,2} & Marilene Henning Vainstein^{1*}.

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

The present study was designed to evaluate the accuracy (A), sensitivity (S) and specificity (SP) of an in house plasmid-based polymerase chain reaction (PCR) test on first void urine specimens from symptomatic and asymptomatic men, for detection of *Chlamydia trachomatis* (CT). Specific primers for the cryptic plasmid of *C. trachomatis* were designed to amplify a 201 bp fragment confirmed by enzymatic cleavage and automatic sequencing. The analytic specificity was determined by submitting to the intended protocol, the DNA of normal and pathogenic urogenital microbiota. The detection limit of the PCR and the Southern blot hybridization was measured in 1 pg of chlamydial DNA. This methodology was compared to the COBAS Amplicor CT/NG that was considered the reference test and contains an internal control (IC) programme to identify DNA polymerase inhibition.

Among 37 positive specimens by COBAS Amplicor, 33 were confirmed positive by in house PCR and inhibitors of PCR were demonstrated in the 4 possibly false-negative samples performing DNA chlamydial spiking experiments and using a positive internal control of human β -globin DNA. The specimens were freeze-thawed and re-tested to remove labile inhibitors, but 2 samples remained negative. Among 74 negative specimens by COBAS Amplicor, 72 were confirmed negative by in house PCR. The 2 probably false-positive samples were re-tested and just one remained positive. The final results of the two tests were identical for 108 of the 111 patients, A = 97.3%; S = 94.6% and SP = 98.6%.

This study shows that the in house plasmid-based PCR is feasible for detection of *C. trachomatis* in male urine specimens. This test revealed high accuracy, sensitivity and specificity, offering great potential for the screening of men, an important reservoir of infection chlamydial for women.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*, PCR, diagnostic, urine specimens, men.

Introduction

Chlamydia trachomatis is the most common sexually transmitted bacterial pathogen. In 1995, the World Health Organization (WHO) estimated that 89 million cases of *C. trachomatis* infection occurred worldwide (Stamm, 1999). It causes adverse reproductive consequences in women and in infants exposed to the organism at birth, conjunctivitis and pneumonia (Schachter *et al.*, 2005). In men the primary complications of chlamydial urethritis are epididymitis and sexually reactive arthritis, including Reiter's syndrome (Stamm *et al.*, 2005). Although most of chlamydial disease occur in women and sequelae such as pelvic inflammatory diseases, ectopic pregnancy, infertility, and chronic pelvic pain affect women, men serve as reservoirs for sustained transmission to and reinfection of female partners. Thus there is increasing public health interest in screening men as a prevention measure to help reduce reservoirs of infection available for transmission to women (Gaydos & Rompalo, 2002; Mardh, 2004).

Studies suggest that chlamydial infection of the lower genital tract may be an important risk factor facilitating sexual transmission of HIV and seems also to be associated with cervical cancer (Stamm, 1999; Silins *et al.*, 2005).

For all these reasons, improved means for prevention and control of *Chlamydia trachomatis* infection are urgently needed. 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, and that these infections may persist for months to years (Black, 1997; Stamm, 1999).

Asymptomatic young men are an important reservoir for infection and are less likely than women to be detected in the course of usual care. There is good evidence showing that treatment of men can eradicate chlamydial infection (USPSTF, 2001).

Sexually transmitted diseases (STD) have historically proven to be among the most challenging infections to diagnose with laboratory tests. This is because of difficulties in obtaining the invasively acquired clinical specimens that are required for so many tests and culturing highly fastidious agents, such as *C. trachomatis*. The availability of nucleic acid amplification tests (NAATs) precludes any need to culture agents from specimens for accurate diagnosis and permits the use of specimens acquired with noninvasive or less invasive methods, such as urine and vaginal specimens, more acceptable to patients (Toye *et al.*, 1998; Black & Morse, 2000; Schachter *et al.*, 2005).

Culture was once thought to be the gold standard for the detection of *C. trachomatis* in clinical specimens and it is now known, because of the extremely high sensitivity of DNA amplified technology, that culture may have a sensitivity ranging from only 50% to 85% (Schachter, 2001; Gaydos & Rompalo, 2002).

Most of commercial NAAT for detection of *C. trachomatis* are based on the cryptic plasmid, considered an excellent target for diagnostic tests. This 7500 bp plasmid is highly conserved in *C. trachomatis* species (less than 1% variability) and is presented in 7-10 copies/EB (elementary body). Therefore the plasmid-based PCR

tests are more sensitive than chromosome-based PCR for the detection of *C. trachomatis* (Mahony *et al.*, 1993; Thomas *et al.*, 1997).

The present study was conducted to develop an in house plasmid-based PCR, for the detection of *C. trachomatis* DNA in urine specimens from symptomatic and asymptomatic men.

Materials and Methods

Specimens. One hundred-eleven male urine specimens were obtained from a collection of the Prevalence and Relative Frequencies of STD National Survey, collected from August to December 2003. Eighty-seven specimens were from symptomatic men attending in a STD clinic and twenty-four were from asymptomatic industry workers men, with or without signs of urethritis. Informed consent was obtained from all patients. First-void urine specimens, 20-30 ml, were collected in clean cups without preservatives and transferred to sterile plastic containers (three aliquots). The patient had not urinated in the 3 h before specimen collection. The specimens were stored at 4°C and transported to the laboratory within 24 h. Specimens were kept under -20° C until processing.

PCR COBAS Amplicor CT/NG. Roche Amplicor *C. trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* PCR (Roche Diagnostics Systems, Switzerland) was performed according to the manufacturer's instructions. An internal DNA control provided with the Roche assay was added to the master mix to monitor inhibition of the PCR assay and to ensure the validity of negative results in each run.

In house plasmid-based PCR assay. All aliquots of urine tested by the commercial method, were processed for in house PCR as follows: 500 µl of each specimen were submitted to DNA purification with DNAzol (Gibco BRL and Life Technologies, Rockville, Md.), based on the use of a guanidine detergent lysing solution that hydrolyses RNA and allows the selective precipitation of DNA from a cell lysate, according to the manufacture's package insert (Chomezynski *et al.*, 1997; Rodrigues *et al.*, 2002). After this, the samples were extracted with phenol-chloroform and ethanol precipitated, preventing PCR inhibition.

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; Lan *et al.*, 1993).

PCR was performed with a final volume of 50 µl containing final concentrations of 50 mM KCL, 3.0 mM MgCl₂, 10 mM tris-HCL (pH 8.3), 200 µM of each deoxynucleoside triphosphate (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 12.5 pmol of each primer, and 1 U of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies). The PCR amplification consisted of DNA desnaturation at 95°C for 4 min followed by 40 cycles of amplification in a thermocycler (MJ Research PTC 96). Each cycle consisted of a desnaturation step at 95°C for 1 min, an annealing step at 57°C for 1 min, 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 10 µl of the PCR product was analyzed by electrophoresis 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide and 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 Labeling 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).

DNA cleavage and sequencing. The *C. trachomatis* specific sequence of 201 pb was confirmed by EcoRV cleavage. The reaction mixture consisted of buffer 10x (Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM), EcoRV 1 U/μg DNA amplification product. Reaction was carried out 1 h at 37°C and the cleavage products were checked by 3.0% agarose gel electrophoresis. The 201 pb 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) and compared to nucleotide sequences deposited in the GenBank.

Determination of specificity. The analytic specificity of primers CTP1 and CTP2 was tested by DNA amplification of microorganisms from male normal genital microbiota, pathogenic agents and human DNA. Urine samples tested negative for CT by commercial PCR were contaminated with clinical isolates of: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus sp* negative coagulase, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *Candida albicans*, *Trichomonas vaginalis*, *Human Papillomavirus* (HPV) 16 and 33 sub-types and submitted to the same DNA purification protocol applied to clinical samples.

Determination of sensitivity. The analytic sensitivity or detection limit of the plasmid-based PCR was determined with *C. trachomatis* Serotype L2 DNA dilutions from 30 ng/μl to 50 fg/μl in 1.5% agarose gel electrophoresis and Southern blot hybridization.

In house PCR inhibitor determination. Negative results that may have been caused by PCR inhibitory substances in the specimen extraction were identified by chlamydial DNA spiking experiments and by amplification failure of the 264 bp human β-globin DNA internal control. The primers used for generating a 264 bp fragment were PC04 (5'- CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC – 3') and GH20 (5' – GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC – 3') (Swan *et al.*, 1999; Strauss *et al.*, 2002).

Analysis of discrepant results. Any specimens that gave discordant results in the in house and Roche PCR assays were re-tested, by in house PCR, with a fresh extraction of the urine stored at -20°C.

Statistical analysis. Accuracy, sensitivity and specificity were calculated before and after resolution of discrepant results according to standard formulae (Fletcher *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 1997) and SPSS 12.0. computer program.

Results

Confirmation of the 201 pb fragment sequence. The unique restriction site of EcoRV originated two fragments of 130 pb and 71 pb as expected to confirm the 201 pb sequence of the cryptic plasmid of *C. trachomatis*. The analysis of the automatic sequencing showed 100% homology with sequence from LGV440 plasmid of *C. trachomatis* deposited in GenBank (Access number AE001273).

Specificity and detection limit of the in house plasmid-based PCR. The expected 201 pb product was only obtained from *C. trachomatis* DNA and no amplification products were obtained with other microorganism DNA samples. Specific amplification with primers CTP1 and CTP2 was therefore confirmed (results not shown).

Detection limit of the in house plasmid-based PCR in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide electrophoresis and Southern blot hybridization was 1 pg of chlamydial DNA (Figure 1).

Comparative analysis of the COBAS Amplicor PCR and in house plasmid-based PCR. In this experiment were used 111 male urine samples previously tested for *C. trachomatis* infection by the COBAS Amplicor CT/NG Assay. From these samples 37 gave positive and 74 gave negative results. Among the 37 tested positive samples, 8 were from asymptomatic men and 29 from symptomatic man. Results from 33 samples were confirmed positive by in house PCR and 4 were considered possibly false-negative results (Table 1). Among 74 samples negative results tested by COBAS Amplicor, 16 were from asymptomatic men and 58 were from symptomatic men. Results from 72 samples were confirmed negative by in house PCR and 2 were considered possibly false-positive results (Table 2). All 24 samples from asymptomatic men presented the same results in both assays, but were found 6 different results in symptomatic men samples (4 false-positive and 2 false-negative). The sensitivity (S) found in house plasmid-based PCR was 89.2%, the specificity (SP) 97.3% and accuracy (A) 94.6%, before re-testing of discordant results.

In house PCR inhibitor determination. Inhibitors of PCR were demonstrated in the 4 false-negative samples performing by spiking experiments with chlamydial DNA and by amplification failure of the 264 bp human β -globin DNA internal control (results not shown).

Analysis of discrepant results. The 6 specimens that gave discordant results in the in house plasmid-based PCR and Roche PCR assays were re-tested, by in house PCR, with a fresh extraction of the urine stored at -20°C. From the 4 false-negative result samples, 2 became positive and from the 2 false-positive 1 became negative after re-testing assay. So, the final results were: S=94.6%; SP=98.6% and A=97.3%.

Discussion

C. trachomatis PCR assay has proved to be effective when performed on male first-void urine. The test has identified more infected men than culture or EIE, and the presence or absence of symptoms of urethritis has not affected the positive rate (Warford *et al.*, 1999; Sugunendran *et al.*, 2001; Chernesky *et al.*, 2005).

The specificity of primers CTP1 and CTP2 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 by submitting to amplification DNA of normal and pathogenic male microbiota, and human DNA. STD suspected specimens are highly contaminated and in this study 44.8% of the symptomatic patients tested positive for *C. trachomatis*, were co-infected with *N. gonorrhoeae*.

After re-testing just 1 sample remained false-positive. The high specificity of PCR means that the only false-positive reactions which are likely to occur are due to contamination, either with previously amplified product or due to carry-over between samples (Rasmussen *et al.*, 1993). In this study, standard precautions to decrease the likelihood of cross-contamination were taken, including isolate work areas, the use of aerosol-free pipette tips and gloves, reagents divided into aliquots, autoclaved solutions and the inclusion of negative controls for each reaction step (Kwok & Higuchi, 1989).

A selective inhibition of the *C. trachomatis* target amplification and a preferential internal control amplification causing false-negative results was reported in PCR Amplicor (Berg *et al.*, 2005). This in house PCR false-positive result is from a symptomatic patient co-infected with *N. gonorrhoeae*. The test was performed positive twice in two different urine aliquots, perhaps it could be accepted as a real positive based on clinical sensitivity (“infected patient standard”) (Gaydos *et al.*, 2004).

In the 4 samples that presented false-negative results for *C. trachomatis*, the presence of inhibitory substances was investigated by using two amplification controls, the human β globin DNA primers and samples spiking with chlamydial DNA.

It has been observed in several studies specimens initially falsely negative for *C. trachomatis* DNA that became positive after storage and repeated testing. Thus, substances that inhibit PCR may be temperature sensitive or become inactive over time, since storage of specimens at low temperatures or even heating to 95°C, has allowed for resolution of inhibition (Toye *et al.*, 1998; Cook & Ostergaard, 2003). The mechanism involved in the removal of amplification inhibitors remains unknown. Dilution alone may remove inhibitory activity, but the major potential disadvantage of using dilution to eliminate PCR inhibitor is that this may result in missing a *C. trachomatis*-positive specimen containing low numbers of target DNA copies. Alternatively, freezing and thawing may release additional target DNA molecules by disrupting microbial cells more efficiently or may act directly on labile proteinaceous inhibitors, including conformational changes and the subsequent loss of inhibitory activity. Salts, especially those containing divalent cations, particularly

Mg²⁺ ions, which have a significant effect on the activity of *Taq* polymerase, could explain the inhibitory activity of urinary crystals for PCR (Mahony *et al.*, 1998).

In this study the 4 samples presented false-negative results were re-tested after freezing (-20°C) and thawing, this procedure was able to eliminate 50% of inhibitory substances, but 2 samples remained false-negative. Mahony *et al.* (1998) removed all PCR inhibitory substances by phenol-chloroform extraction and dilution of the sample 1:10. In this work we have used only phenol-chloroform without dilution and residual inhibitors probably remained in sample pellet.

False-negative results may be observed in NAAT when the number of targets in a sample is low because of sampling variability (Chong *et al.*, 2003). The source of variation that affect the test performance may be the volume of urine collected, inhibition by residual urine after pelleting or loss of target during processing procedures (Black *et al.*, 2002; Moncada *et al.*, 2003).

To improve the in house PCR sensitivity, complete urinalysis including dipstick and a microscopic examination must be done to detect possible regional differences in rates of PCR inhibition. Moreover the use of an internal control (IC) ensures the integrity of negative results and maximizes test sensitivity by monitoring amplification for specimens with negative test results for *C. trachomatis*. The added cost of using the IC corresponds to the cost for reagents, but the workload is almost identical. This cost can be minimized using the IC only for those specimens that test negative for *C. trachomatis*, although it is more time-consuming by re-testing (Vincelette *et al.*, 1999; Betsou *et al.*, 2003).

PCR analysis of urine is therefore a highly sensitive and specific non invasive technique for the diagnosis of *C. trachomatis* and provides a unique opportunity for the early identification of both asymptomatic and symptomatic infected patients. Urine probably will be the specimen of choice in the future, as it is easy to collect and can be used for detection of multiple pathogens (Jaschek *et al.* 1993; Chan *et al.*, 2000).

The future of chlamydia control depends on introducing widespread, targeted screening of at-risk populations but the currently available tests remain costly particularly for public health laboratories. Pooling of urine specimens for nucleic acid amplification testing may be a solution to this economic challenge, cost effectiveness analysis showed that in high-prevalence populations, smaller pools are more cost effective, whereas the opposite is true of low-prevalence populations (Kacena *et al.*, 1998; Peeling *et al.*, 1998; Black & Morse, 2000; Martin, 2000; Morr e *et al.*, 2000; Currie *et al.*, 2004).

The results reported in this paper for the in house plasmid-based PCR produced accurate results. Initially this methodology was proposed for diagnosis, but may be used for screening and confirmation testing by the high degree of sensitivity and specificity presented. Nevertheless, it is not an automatized method, being labor-intensive and time-consuming, therefore must be recommended just for small routine.

Our next step is to introduce a new protocol for detection of *C. trachomatis* by real-time PCR, to decrease the analysis time in routine diagnostics, thus permitting investigation of large sample numbers in a short time. In real-time PCR

the formation of PCR products is continuously monitored within the sealed reaction tubes, presenting low risk for cross-contamination. It is also useful for high throughput testing of pooled samples (Eickhoff *et al.*, 2003). Although financial constraints are projected as impediments to the routine use of molecular diagnostic methods in developing countries like Brazil, it should be borne in mind that the cost arising from the clinic sequelae of leaving genital *C. trachomatis* infections undiagnosed and untreated may exceed the cost of these diagnostic methods.

Acknowledgments

This work was funded by CEARGS (Centro de Estudos de Aids/DST do Rio Grande do Sul, Brasil) and Center for Aids Prevention Studies, University of California – San Francisco / US Fogart International Center: ICOHRTA Grant # 1D43TW05799.

References

- Berg, E. S., Storvold, G., Anestad, G., Moi, H. & Skaug, K. (2005).** Reability of the Amplicor internal control to disclose false-negative *Chlamydia trachomatis* PCR results. *Journal of Microbiological Methods* **60**, 125-129.
- Betsou, F., Beaumont, K., Sueur, J. M. & Orfila, J. (2003).** Construction and Evaluation of Internal Control DNA for PCR Application of *Chlamydia trachomatis* DNA from Urine Samples. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1274-1276.
- Black, C., M. (1997).** Current Methods of Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. *Clinical Microbiology Reviews* **10**, 160-184.
- Black, C. & Morse, S. (2000).** The Use of Molecular Techniques for the Diagnosis and Epidemiologic Study of Sexually Transmitted Infections. *Current Infectious Disease Reports*, 31-43.
- Black, C. M., Marrazo, J., Johnson, R. E., Hook III, E. W., Jones, R. B., Green, T. A., Schachter, J., Stamm, W. E., Bolan, G., St. Louis, M. E. & Martin, D. H. (2002).** Head-to-Head Multicenter Comparison of DNA Probe and Nucliaic Acid Amplification Tests for *Chlamydia trachomatis* Infection in Women Performed with an Improved Reference Standard. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3757-3763.
- Chan, E. L., Brandt, K., Olienus, K., Antonishyn, N. & Horsman, G. B. (2000).** Performance Characteristics of the Becton Dickinson ProbeTec System for Direct Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Male and Female Urine Specimens in Comparison With the Roche Cobas System. *Arch Pathol Lab Med* **124**, 1649-1652.
- Chernesky, M. A., Martin, D. H., Hook, E. W., Willis, D., Jordan, J., Wang, S., Lane, J. R., Fuller, D. & Schachter, J. (2005).** Ability of New APTIMA CT and APTIMA GC Assays To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Maile Urine and Urethral Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 127-131.
- Chomezynski, P., Mackey, K., Drews, R. & Wilfinger, W. (1997).** Dnazol: a reagent for the rapid isolation of genomic DNA. *BioTechniques* **22**, 550-553.
- Chong, S., Jang, D., Song, X., Mahony, J., Petrich, A., Barriga, P. & Chernesky, M. (2003).** Specimen Processing and Concentration of *Chlamydia trachomatis* Added Can Influence False-Negative Rates in the LCx Assay but Not in the APTIMA Combo 2 Assay When Testing for Inhibitors. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 778-782.
- Cook, R. L. & Ostergaard, L. (2003).** Current Issues in Screening for *Chlamydia trachomatis*. *Current Infectious Disease Reports* **5**, 153-158.

Currie, M. J., McNiven, M., Yee, T., Schiemer, U. & Bowden, F. J. (2004). Pooling of Clinical Specimens Prior to Testing for *Chlamydia trachomatis* by PCR Is Accurate and Cost Saving. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 4866-4867.

Eickhoff, M., Laue, T., Ruckes, T., Cramer, S. O., Krupp, G. & Tiemann, C. (2003). 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.

Elder, B. L., Hansen, S. A., Kellogg, J. A., Marsik, F. J. & Zabranski, R. J. (1997). Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. In *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology - 31*, pp. 1-18. Washington: ASM Press.

Fletcher, R. H., Fletcher, S. W. & Wagner, E. H. (1996). *Epidemiologia Clínica: Elementos essenciais*, 3 edn. Porto Alegre-RS: Artes Médicas.

Gaydos, C. A. & Rompalo, A. M. (2002). The Use of Urine and Self-obtained Vaginal Swabs for the Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases. *Current Infectious Disease Reports* **4**, 148-157.

Gaydos, C. A., Theodore, M., Dalesio, N., Wood, B. J. & Quinn, T. C. (2004). Comparison of Three Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 3041-3045.

Griffais, R. & Thibon, M. (1989). Detection of *Chlamydia trachomatis* by the Polymerase Chain Reaction. *Res. Microbiol.*, 139-141.

Jaschek, G., Gaydos, C. A., Welsh, L. E. & Quinn, T. (1993). Direct Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens from Symptomatic and Asymptomatic Men by Using a Rapid Polymerase Chain Reaction Assay. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 1209-1212.

Kacena, K. A., Quinn, S. B., Howell, M. R., Madico, G. E., Quinn, T. C. & Gaydos, C. A. (1998). Pooling Urine Samples for Ligase Chain Reaction Screening for Genital *Chlamydia trachomatis* Infection in Asymptomatic Women. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 481-485.

Kwok, S. & Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. In *Nature*, pp. 237-238.

Lan, J., Walboomers, J. M. M., Roosendaal, R., Van Doornum, G. J. J., MacLaren, D. M., Meijer, C. J. M. L. & Van Den Brule, A. J. C. (1993). 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* **31**, 1060-1065.

Mahony, J. B., Luinstra, K. E., Sellors, J. W. & Chernesky, M. A. (1993). Comparison of Plasmid and Chromosome - Based Polymerase Chain Reaction Assays for Detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 1753-1758.

Mahony, J., Chong, S., Jang, D., Luinstra, K., Faught, M., Dalby, D., Sellors, J. & Chernesky, M. (1998). Urine Specimens from Pregnant and Nonpregnant Women Inhibitory to Amplification of *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acid by PCR, Ligase Chain Reaction, and Transcription - Mediated Amplification: Identification of Urinary Substances Associated with Inhibition and Removal of Inhibitory Activity. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3122-3126.

Mardh, P. A. (2004). Tubal factor infertility, with special regard to chlamydial salpingitis. *Current Opinion in Infectious Diseases* **17**, 49-52.

Martin, D. H. (2000). Preventing *Chlamydia trachomatis* Infections: A Changing Paradigm. *Current Infectious Disease Reports* **2**, 7-9.

Moncada, J., Chow, J. M. & Schachter, J. (2003). Volume Effect on Sensitivity of Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urine Specimens from Females. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 4842-4843.

Morré, S. A., Meijer, C. J. L. M., Munk, C., Krüger-Kjaer, S., Winter, J. F., Jorgensens, H. O. & Van Den Brule, A. J. C. (2000). Pooling of Urine Specimens for Detection of Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* Infections by PCR in a Low-Prevalence Population: Cost-Saving Strategy for Epidemiological Studies and Screening Programs. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 1679-1680.

Peeling, R. W., Toye, B., Jessamine, P. & Gemmill, I. (1998). Pooling of urine specimens for PCR testing: a cost saving strategy for *Chlamydia trachomatis* control programmes. *Sex Transm. Infect.* **74**, 66-70.

Rasmussen, S. J., Smith-Vaughan, H., Nelson, M., Chan, S. W., Timms, P. & Capon, A. G. (1993). Detection of *Chlamydia trachomatis* in urine using enzyme immunoassay and DNA amplification. *Molecular and cellular Probes* **7**, 425-430.

Rodrigues, V. F. S., Mello, F. C. Q., Ribeiro, M. O., Fonseca, L., Kritski, A. L., Rossetti, M. L. & Zaha, A. (2002). Detection of *Mycobacterium avium* in Blood Samples of Patients with AIDS by Using PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 2297-2299.

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

Schachter, J., Hook III, E. W., Martin, D. H., Willis, D., Fine, P., Fuller, D., Jordan, J., Janda, W. M. & Chernesky, M. (2005). Confirming Positive Results of Nucleic Acid Amplification Tests (NAATs) for *Chlamydia trachomatis*: All NAATs Are Not Created Equal. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 1372-1373.

Silins, I., Ryd, W., Strand, A., Wadell, G., Tornberg, S., Hansson, B. G., Wang, X., Arnheim, L., Dahl, V., Bremell, D., Persson, K., Dillner, J. & Rylander, E. (2005). *Chlamydia trachomatis* infection and persistence of human papillomavirus. *Int J Cancer* **116**, 110-115.

Stamm, W. E. (1999). *Chlamydia trachomatis* Infections: Progress and Problems. *JID* **179**, S380-S383.

Stamm, W. E., Jones, R. B. & Batteiger, B. E. (2005). *Chlamydia trachomatis* (Trachoma, Perinatal Infections, Lymphogranuloma Venereum, and Others Genital Infections). In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, p. 2239-2255. Philadelphia: Elsevier, Churchill Livingstone.

Strauss, S., Sastry, P., Sonnex, C., Edwards, S. & Gray, J. (2002). Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses. *Sex Transm. Infect.* **78**, 135-138.

Sugunendran, H., Birley, H. D. L., Mallinson, H., Abbott, M. & Tong, C. Y. W. (2001). Comparison of urine, first and second endourethral swabs for PCR based detection of genital *Chlamydia trachomatis* infection in male patients. *Sex Transm. Infect.* **77**, 423-426.

Swan, D. C., Tucker, R. A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M. F., Wideroff, L., Unger, E. R., Nisenbaum, R. A., Reeves, W. C. & Icenogle, J. P. (1999). Human Papillomavirus (HPV) DNA Copy Number Is Dependent on Grade of Cervical Disease and HPV Type. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 1030-1034.

Thomas, N. S., Lusher, M., Storey, C. C. & Clarke, I. N. (1997). Plasmid diversity in *Chlamydia*. *Microbiology*, 1847-1854.

Toye, B., Woods, W., Bobrowska, M. & K., R. (1998). Inhibition of PCR in Genital and Urine Specimens Submitted for *Chlamydia trachomatis* Testing. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 2356-2358.

USPSTF (2001). Screening for Chlamydial Infection-Recommendations and Rationale. U.S. Preventive Services Task Force. *Am J Prev Med* **20**.

Vincelette, J., Schirm, J., Bogard, M., Bourgault, A. M., Luijt, D. S., Bianchi, A., van Voorst Vader, P. C., Butcher, A. & Rosenstraus, M. (1999). Multicenter Evaluation of the Fully Automated COBAS AMPLICOR PCR Test for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urogenital Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 74-80.

Warford, A., Chernesky, M. & Peterson, E. M. (1999). Laboratory Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology*, Washington, D.C. ASM Press, 19^A, 2-18.

Table 1. Positive samples for *Chlamydia trachomatis* by COBAS Amplicor PCR X In house plasmid-based PCR.

<i>Chlamydia trachomatis</i> positive samples by COBAS- Amplicor					
Male first-void urine	PCR Cobas Amplicor	In House PCR		Re-tested In house PCR	
		pos	neg	pos	neg
Industry workers (asymptomatic)	8	8	0	-	-
STD Clinic (symptomatic)	29	25	4	2	2
Total	37	37		4	
Divergent results	-	4		2	

STD: Sexually transmitted diseases; PCR: Polymerase Chain reaction; pos: positive; neg:negative.

Table 2. Negative samples for *Chlamydia trachomatis* by COBAS Amplicor PCR X In house plasmid-based PCR.

<i>Chlamydia trachomatis</i> negative samples by COBAS Amplicor					
Male first-void urine	PCR Cobas Amplicor	In House PCR		Re-tested In house PCR	
		neg	pos	pos	neg
Industry workers (asymptomatic)	16	0	16	-	-
STD Clinic (symptomatic)	58	2	56	1	1
Total	74	74		2	
Divergent results	-	2		1	

STD: Sexually transmitted diseases; PCR: Polymerase Chain reaction; pos: positive; neg:negative.

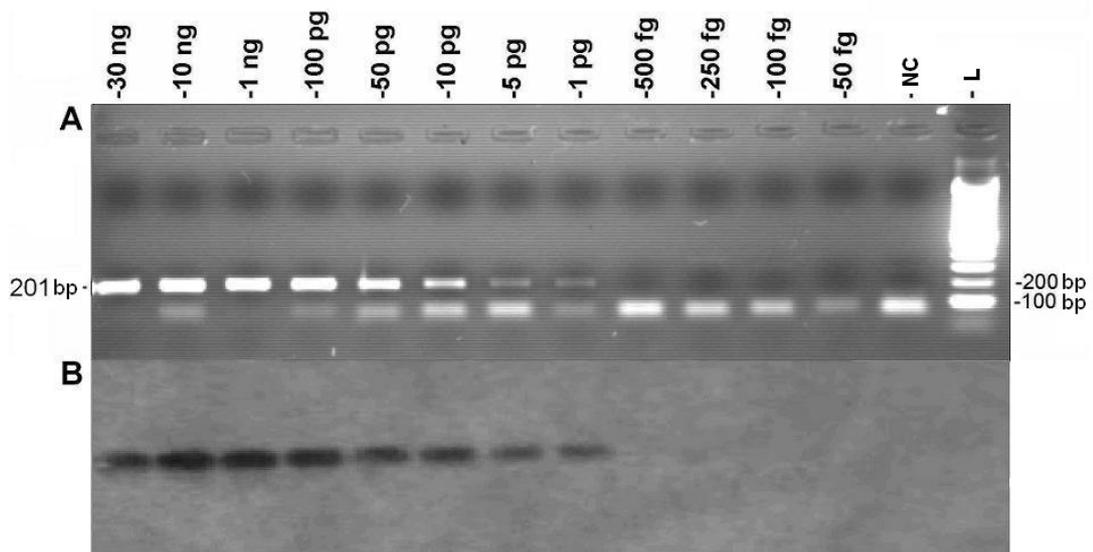


Figure 1. Analytical sensitivity of in house plasmid-based PCR. A. PCR product (201 bp) was analysed by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. Eleven serial dilutions of *C. trachomatis* DNA from 30 ng to 50 fg; NC: negative control; L: 100 bp ladder (Invitrogen).

B. Southern blot hybridization autoradiography