



Universidade de Brasília  
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**Andersen Charles Darós**

**CITOLOGIA DE AMOSTRAS CERVICAIS COM INFECÇÕES  
SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS DETECTADAS POR  
MULTIPLEX PCR**

Brasília-DF

2020

**Universidade de Brasília**  
**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**ANDERSEN CHARLES DARÓS**

**CITOLOGIA DE AMOSTRAS CERVICAIS COM INFECÇÕES  
SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS DETECTADAS POR  
MULTIPLEX PCR**

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fabiana Pirani Carneiro.

Brasília-DF

2020

# ANDERSEN CHARLES DARÓS

## CITOLOGIA DE AMOSTRAS CERVICAIS COM INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS DETECTADAS POR MULTIPLEX PCR

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro (Presidente)  
Universidade de Brasília - UnB

---

---

Prof. Dr. Albino Verçosa de Magalhães (Membro externo)  
Universidade de Brasília - UnB

---

---

Profa. Dra. Rosângela Vieira de Andrade (Membro externo)  
Universidade Católica de Brasília - UCB

---

---

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva (Membro interno)  
Universidade de Brasília - UnB

---

---

Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista de Amorim (Membro suplente)  
Universidade de Brasília - UnB

---

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que sempre ajudou e acreditou em meu potencial, onde mesmo em meio aos desafios sempre mostrava um horizonte cheio de esperança. Em especial à Adriana minha maravilhosa esposa e mãe fantástica, e meus filhos Ana Luiza, Gabriel e Thiago, todo meu amor e dedicação;

À Prof.<sup>a</sup> Fabiana Pirani por sua disponibilidade de forma pedagógica me ajudando a cumprir com êxito este projeto de forma científica e pessoal, do qual obtive perspicaz aprendizado;

À Prof.<sup>a</sup> Andrea Barretto Motoyama pela valorosa contribuição ao longo deste trabalho;

Ao Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília, meus mais que sinceros agradecimentos a todos pela cooperação com a coleta de dados;

À Professora Fabiana Brandão Alves Silva pelas valorosas sugestões para o aprimoramento científico deste trabalho.



## RESUMO

**Introdução.** Apesar da crescente aplicação de métodos de diagnóstico molecular para a detecção de infecções sexualmente transmissíveis, os achados em citologia cervical de pacientes com patógenos que podem ser identificados apenas por PCR e cultura ainda não estão bem descritos. **Objetivo.** Descrever os achados citológicos em amostras cervicais de pacientes com *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*. **Métodos.** Amostras cervicais para citologia (convencional e em base líquida) e para multiplex PCR foram coletadas de mulheres com idade entre 23 e 54 anos de idade, submetidas a triagem de rotina no intervalo de tempo entre 2017 a 2018 no serviço de Ginecologia do Hospital Universitário de Brasília. **Resultados.** Através de multiplex PCR foi possível detectar pelo menos um destes patógenos em 36,47% (17/47) das amostras: *Ureaplasma parvum* 17,02%; *Ureaplasma urealyticum* 2,12%; *Mycoplasma hominis* 8,51%; *Mycoplasma genitalium* 0,0%; *Chlamydia trachomatis* 10,63%; *Neisseria gonorrhoeae* 2,12% e *Trichomonas vaginalis* 10,63%. Mais de um destes patógenos foram observados em 12,76% (6/47) das amostras. A cervicite microscópica ( $\geq 10$  pmnl/célula epitelial) e microbiota predominantemente lactobacilar foram os achados mais frequentes nas amostras em que os patógenos foram detectados sozinhos ou em infecção múltipla, exceto nas amostras com *Trichomonas vaginalis* nas quais a microbiota cocobacilar foi a mais comum. Em amostras com microbiota normal (lactobacilar) com e sem patógenos detectados por multiplex PCR, a frequência de cervicite microscópica foi, respectivamente, 90,9% (10/11) e 25% (2/8). Em amostras com cervicite microscópica e microbiota normal, aquelas com pelo menos um patógeno identificado por multiplex PCR foram significativamente mais frequentes do que aquelas sem patógeno, 83,33% x 16,66% (teste de Fisher  $p = 0,006$ ). **Conclusão.** Os achados da citologia cervical são inespecíficos e caracterizados por cervicite microscópica e microbiota predominantemente lactobacilar em amostras nas quais *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* foram identificados por multiplex PCR. A falha em identificar um agente inflamatório em amostras de citologia cervical com intenso exsudato de neutrófilos e microbiota normal pode sugerir a presença de um ou mais destes microorganismos patogênicos. Uma observação sobre a intensidade da inflamação deve constar em laudos dos exames citológicos cervicais, para que possa ser correlacionada com os resultados clínicos e de PCR.

**Palavras-chave:** citologia cervical, exame de Papanicolaou, microbiota, multiplex PCR

## ABSTRACT

**Introduction.** Despite the increasing application of molecular diagnostic methods for the detection of sexually transmitted infections, the cytological findings in pap smears of patients with pathogens only identified by PCR and culture are not yet well described. The aim of this study is to describe the most common cytological features in pap smears of patients with *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. **Methods.** Cervical samples for conventional and liquid-based cytology and for multiplex PCR were collected from women ranging from 23 to 54 years old, who underwent routine screening in 2017–2018 at Gynecology service. **Results.** Multiplex PCR was positive in 36.47% (17/47) of the samples: *Ureaplasma parvum* 17.02%; *Ureaplasma urealyticum* 2.12%; *Mycoplasma hominis* 8.51%; *Mycoplasma genitalium* (0); *Chlamydia trachomatis* 10.63%; *Neisseria gonorrhoeae* 2.12% and *Trichomonas vaginalis* 10.63%. Multiple pathogens were observed in 12.76% (6/47). Microscopic cervicitis ( $\geq 10$  pmnl /epithelial cell) and predominantly lactobacillary microbiota were the most frequent findings in the samples in which the pathogens were isolated alone and / or in multiple infections, except for samples with *Trichomonas vaginalis* in which the cocobacillary microbiota was the most common. In samples with normal (lactobacillar) microbiota, with and without pathogens detected by multiplex PCR, the frequency of microscopic cervicitis was, respectively, 90.9% (10/11) and 25% (2/8). In samples with microscopic cervicitis and normal (lactobacillary) microbiota, those with at least one pathogen identified by multiplex PCR were significantly more frequent than those with no pathogen, 83.33% x 16.66% (Fisher's test  $p = 0.006$ ). **Conclusion.** Pap smear findings are nonspecific and characterized by microscopic cervicitis and microbiota predominantly lactobacillary in samples in which *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* were identified by multiplex PCR. Failure to identify an inflammatory agent in pap smear samples with intense neutrophil exudate and normal microbiota may suggest the presence of these pathogens. A remark on the intensity of inflammation should be made in the reports of cervical pap smears so that this cytological finding can be correlated to clinical and PCR results.

**Keywords:** cervical cytology, pap smear, microbiota, multiplex PCR.

## LISTA DE ABREVIACÕES

**ASC-H:** Atypical squamous cells cannot exclude HSIL (células escamosas atípicas de significado indeterminado não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau)

**ASC-US:** Atypical squamous cells of undetermined significance (Células escamosas atípicas de significado indeterminado)

**AV:** Aerobic Vaginitis (Vaginite aeróbica)

**BV:** Bacterial Vaginosis (Vaginose bacteriana)

**CDC:** Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

**CGA:** Campos de grande aumento

**CGA:** Células glandulares atípicas

**CI:** Controle interno

**Cq:** Valor de quantificação

**CSTs:** Community State Types (Tipos de estado da comunidade)

**CT:** *Chlamydia trachomatis*

**Ct:** Valor limiar de ciclo

**DIP:** Doença inflamatória pélvica

**DNA:** Deoxiribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

**EB:** Elementary body (Corpo elementar)

**et al:** *et aliae*, Latim (Entre outros)

**FDA:** Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos)

**GC:** *Neisseria gonorrhoeae* (gonococo)

**HIV:** *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

**HPV:** *Human Papilloma Virus* (Papiloma vírus humano)

**HSIL:** High-grade Squamous Intraepithelial Lesions (Lesão intraepitelial escamosa de alto grau)

**ISTs:** Infecções sexualmente transmissíveis

**LSIL:** Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions (Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau)

**mCMV:** *Citomegalovirus murino*

**MG:** *Mycoplasma genitalium*

**Mhom:** *Mycoplasma hominis*

**NCNGU:** Non-chlamydial and Non-gonococcal Urethritis (Uretrite não gonocócica e não clamídia)

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PAAF:** Punção aspirativa por agulha fina

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

**Pmnl:** Polimorfonucleares

**RB:** Reticulate body (Corpo reticulado)

**RN:** Recém-nascido

**RT-PCR:** Real-time polymerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)

**Sp.:** subespécie (Subespécie não especificada)

**Spp.:** Subespécies (Subspecies não especificadas)

**Tvag:** *Trichomonas vaginalis*

**Uparv:** *Ureaplasma parvum*

**Uurea:** *Ureaplasma urealyticum*

**VO:** Via oral

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fatores associados a eubiose e disbiose da microbiota vaginal.....	2
<b>Figura 2.</b> Papel do <i>Lactobacillus</i> spp. na microbiota vaginal.....	3
<b>Figura 3.</b> Citologia cervical com presença de <i>Lactobacillus</i> spp.....	5
<b>Figura 4.</b> Microbiota anormal da cérvix uterina.....	6
<b>Figura 5.</b> Manejo clínico de ISTs sintomáticas.....	9
<b>Figura 6.</b> Fluxograma para o manejo de corrimento vaginal e cervicite.....	11
<b>Figura 7.</b> Tamanho relativo de <i>M. hominis</i> e <i>Ureaplasma</i> sp. comparado a outros micro-organismos.....	13
<b>Figura 8.</b> Citologia cervical de amostras em que o <i>Ureaplasma</i> spp. foi o único patógeno detectado por multiplex PCR .....	26
<b>Figura 9.</b> Citologia cervical de amostras em que <i>Chlamydia trachomatis</i> foi o único patógeno detectado por multiplex PCR.....	27
<b>Figura 10.</b> Citologia cervical de amostras nas quais <i>Trichomonas vaginalis</i> foi o único patógeno detectado por multiplex PCR.....	28
<b>Figura 11.</b> Citologia cervical de amostras com múltiplos patógenos detectados por multiplex PCR.....	29
<b>Figura 12.</b> Citologia cervical da amostra 16 com múltiplos patógenos ( <i>C. trachomatis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> ) detectados por multiplex PCR.....	30
<b>Figura 13:</b> Frequência de cervicite microscópica em amostras com microbiota normal positivas e negativas nos testes de multiplex PCR.....	31

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Patógenos detectados por multiplex PCR em amostras citológicas cervicais.....	24
<b>Tabela 2.</b> Amostras cervicais com patógenos identificados por multiplex PCR e respectivos achados citológicos (microbiota e presença de cervicite microscópica).....	25
<b>Tabela 3.</b> (APÊNDICE A). Amostras cervicais sem patógenos identificados por multiplex PCR e respectivos achados citológicos (microbiota e presença de cervicite microscópica).....	50

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Principais síndromes em ISTs e os respectivos agentes etiológicos.....	10
---	----

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 MICROBIOTA VAGINAL	1
<b>1.1.1 Microbiota na citologia cervical</b>	<b>4</b>
1.2 INFECCÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS (ISTs)	6
<b>1.2.1 ISTs no Brasil</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2 Cervicovaginites causadas por ISTs</b>	<b>10</b>
1.2.2.1 Cervicites por <i>Chlamydia trachomatis</i> e <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	10
1.2.2.2 Cervicovaginites por <i>Trichomonas vaginalis</i>	12
1.3 UREAPLASMAS SPP. E MYCOPLASMA SPP. NO TRATO GENITAL	13
<b>1.3.1 Mycoplasma genitalium</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2 M. hominis, U. parvum e U. urealyticum</b>	<b>14</b>
1.4 MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE AGENTES INFECCIOSOS EM AMOSTRAS CÉRVICO-VAGINAIS..	16
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>18</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
3.1 OBJETIVO GERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>4. MÉTODOS</b>	<b>20</b>
4.1 APROVAÇÃO ÉTICA E CONSENTIMENTO DOS PARTICIPANTES	20
4.2 AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	20
4.3 CITOLOGIA CERVICAL	20
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA PATÓGENO	21
4.5 MULTIPLEX PCR	22
<b>4.5.1 Princípio do teste</b>	<b>22</b>
<b>4.5.2 Parâmetros para reação de multiplex PCR.</b>	<b>23</b>
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>24</b>
5.1 PATÓGENOS IDENTIFICADOS POR MULTIPLEX PCR.	24
5.2 MICROBIOTA E CERVICITE MICROSCÓPICA.	24
5.3 PATÓGENOS IDENTIFICADOS E RESPECTIVOS ACHADOS CITOLOGICOS NA CITOLOGIA CERVICAL.	25
<b>5.3.1 Ureaplasma spp</b>	<b>25</b>
<b>5.3.2 Chlamydia trachomatis</b>	<b>27</b>
<b>5.3.3 Trichomonas vaginalis</b>	<b>27</b>

<b>5.3.4 Múltiplos patógenos</b>	29
<b>5.4 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS COM E SEM PATÓGENO DETECTADO POR MULTIPLEX PCR.</b>	31
<b>6. DISCUSSÃO</b>	32
6.1 FREQUÊNCIA DOS PATÓGENOS.	32
6.2 CITOLOGIA - CERVICITE.	33
6.3 CITOLOGIA - MICROBIOTA.	35
6.4 CITOLOGIA - ATIPIAS CELULARES.	37
6.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.	37
6.6 PERSPECTIVAS	38
<b>7. CONCLUSÃO</b>	39
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	40
<b>APÊNDICE A</b>	50
<b>ANEXO A</b>	51
<b>ANEXO B</b>	52



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 MICROBIOTA VAGINAL

A microbiota vaginal normal foi inicialmente descrita em 1892, por Albert Döderlein, como homogênea, consistindo apenas de bacilos Gram-positivos (bacilos de Doderlein) [1].

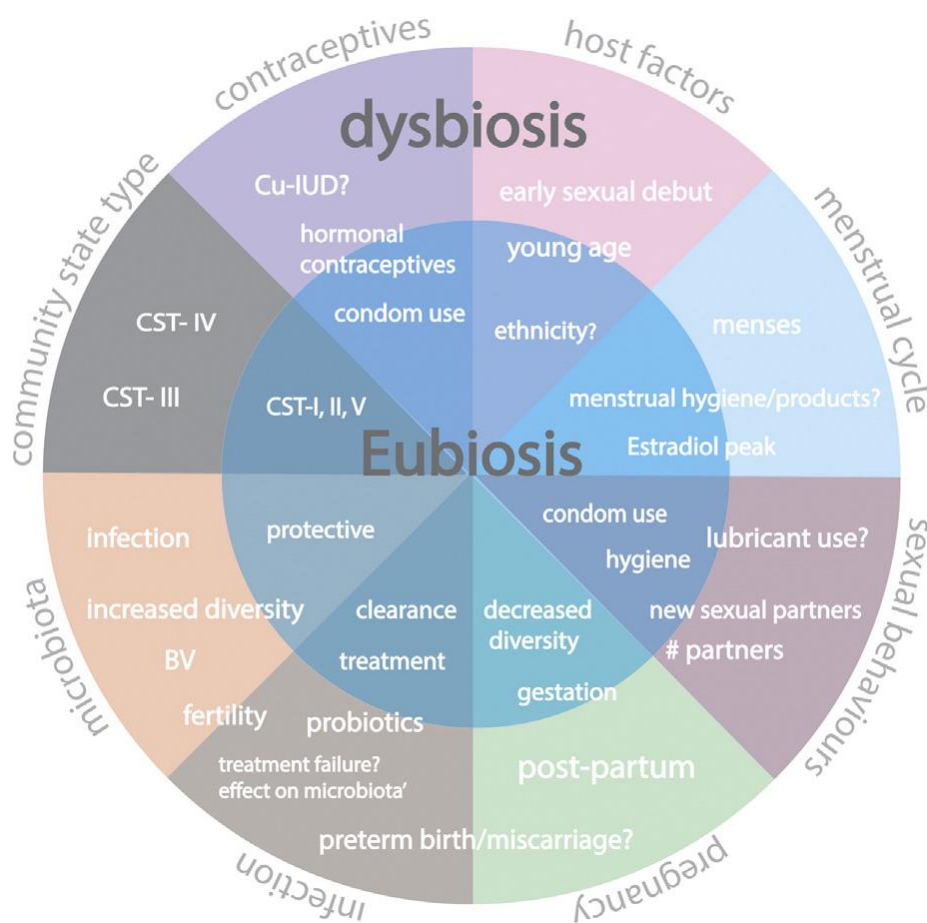
Com os avanços recentes nas técnicas de sequenciamento de DNA e de testes de biologia molecular, há uma classificação da composição da microbiota vaginal, agrupando os micro-organismos em cinco tipos referidos como *Community State Types* (CSTs), quatro dominados por *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus crispatus* (CST I), *Lactobacillus gasseri* (CST II), *Lactobacillus iners* (CST III) ou *Lactobacillus jensenii* (CST V) [2].

CST IV é caracterizada por redução do número de lactobacilos e por crescimento de outras bactérias endógenas e potencialmente patogênicas que podem resultar em disbioses comuns tais como vaginose bacteriana (bacterial vaginosis, BV) e vaginite aeróbica (aerobic vaginitis, AV) [3,4,5].

A BV é tipicamente polimicrobiana, caracterizada pela presença de bactérias geralmente anaeróbicas, incluindo *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Mobiluncus* spp., *Atopobium vaginae* e *Megasphaera* spp. [6].

A AV é definida pela presença de comensais ou patógenos entéricos principalmente aeróbicos, incluindo estreptococos do grupo B (*Streptococcus agalactiae*), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. [7].

A frequência das CSTs é diferente de acordo com a origem étnica e pode ser influenciada pela fase da vida da mulher (infância, puberdade, vida reprodutiva, pós menopausa) fase do ciclo menstrual, uso de contraceptivos hormonais, uso de antibióticos, uso de probióticos, terapia de reposição hormonal, atividade sexual e gravidez [8-12]. Os fatores associados a eubiose e disbiose da microbiota vaginal estão dispostos na **Figura 1**.

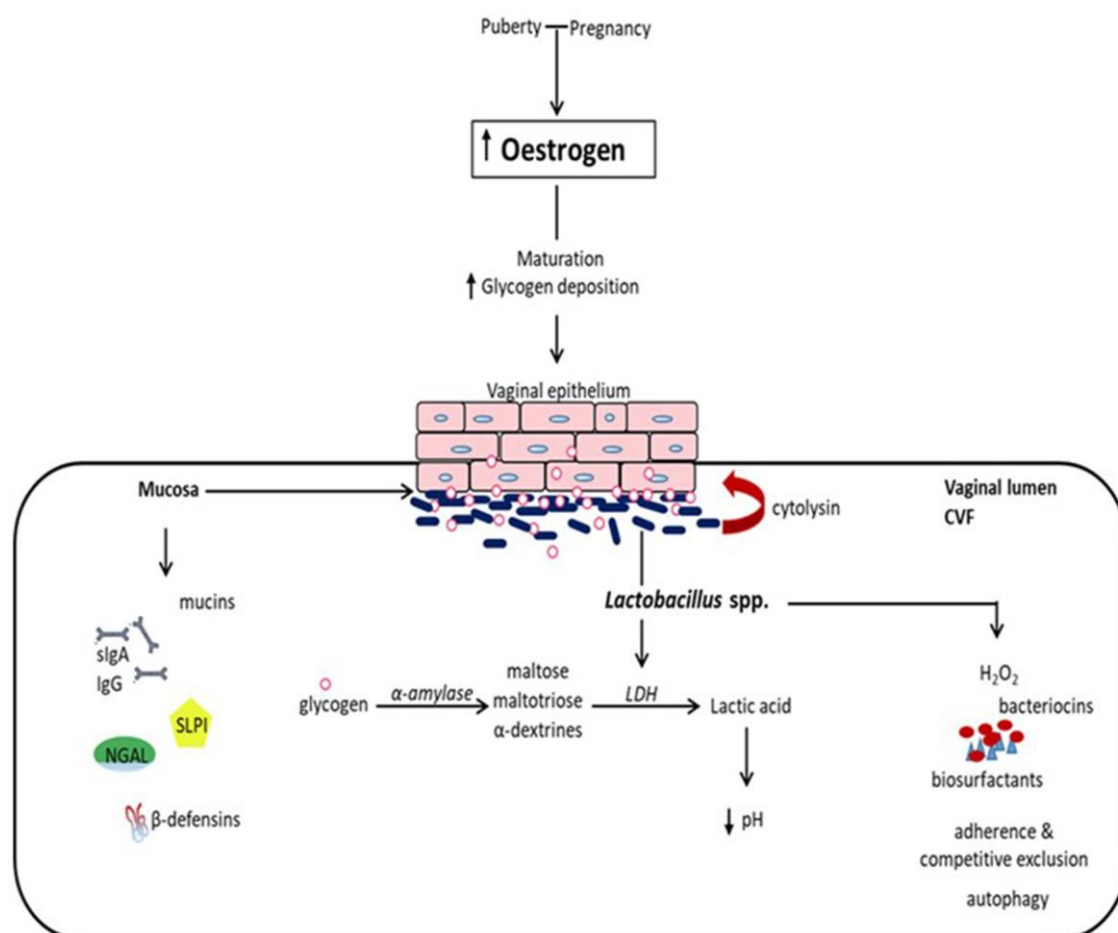


**Figura 1.** Fatores associados a eubiose e disbiose da microbiota vaginal. Fonte: adaptado de [13].

Diferentemente de outras microbiotas corporais, como a intestinal, por exemplo, o aumento da diversidade da microbiota vaginal está associado a suscetibilidade aumentada a doenças [14]. O aumento da diversidade da microbiota vaginal com redução de *Lactobacillus* spp. está envolvido na aquisição e persistência do HPV e no desenvolvimento de pré-câncer cervical e câncer [15].

A microbiota vaginal normal em mulheres em idade reprodutiva é caracterizada por redução diversidade bacteriana e por predomínio de *Lactobacillus* spp. [16]. A estimulação estrogênica promove proliferação, maturação e acúmulo de glicogênio nas células epiteliais da mucosa vaginal [16] (**Figura 2**). O glicogênio é catabolizado pela amilase (produzida pelas células epiteliais da mucosa) em maltose, maltotriose e a-dextrinas, que são então metabolizadas para ácido lático por espécies de *Lactobacillus* [16]. O ambiente ácido (pH 3,5-4,5) é propício ao crescimento de *Lactobacillus* spp. em detrimento de outras espécies bacterianas anaeróbias [16]. Além da produção de ácido

lático, os lactobacilos produzem peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que inibe o crescimento de organismos anaeróbios catalase-negativos pela produção de radicais livres de hidroxila [16]. Ao se ligarem à superfície do epitélio vaginal, *Lactobacillus* spp. impedem competitivamente que outros micro-organismos se liguem e infectem as células epiteliais [16]. Além disto, os lactobacilos podem produzir outros peptídeos antimicrobianos como bacteriocinas, substâncias semelhantes à bacteriocina e biosurfactantes e podem promover a autofagia de bactérias intracelulares, vírus e protozoários [16].



**Figura 2.** Papel do *Lactobacillus* spp. na microbiota vaginal. Fonte: adaptado de [16]

Portanto, através desses mecanismos, os lactobacilos podem inibir o crescimento de bactérias vaginais endógenas potencialmente patogênicas e impedem o crescimento de bactérias exógenas. Por essas razões, uma microbiota vaginal predominantemente lactobacilar tem sido descrita como saudável.

Deve-se ressaltar que o grau de proteção depende da espécie predominante de *Lactobacillus*, por exemplo, uma microbiota vaginal dominada por *L. iners* é menos

estável e mais propensa a transição para disbiose. Em contraste, *L. crispatus* que produz tanto D e L-ácido láctico, está associado a menor probabilidade de transitar para disbiose [17]. Em mulheres não grávidas, microbiotas com predomínio de *L. iners* são significativamente mais propensas a abrigar *Candida* sp. do que microbiotas com predomínio de *L. crispatus*, sugerindo que as espécies de *Lactobacillus* têm relações diferentes com *Candida* sp. [18]. Microbiota vaginal dominada por *L. iners* também está associada a um risco aumentado de infecção por *C. trachomatis* [19].

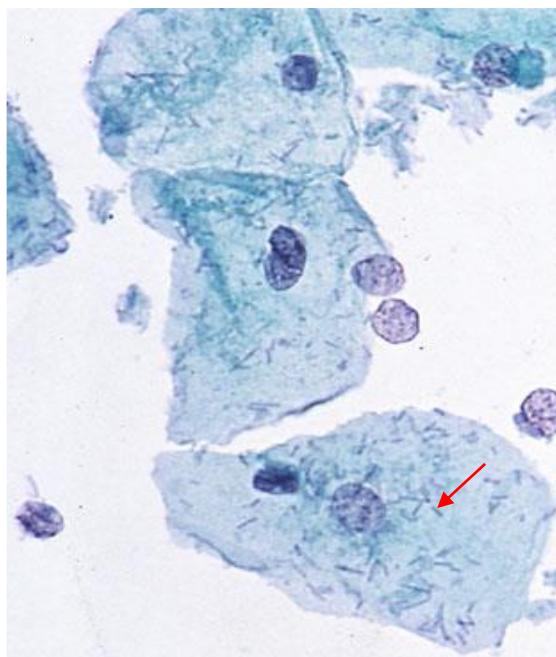
O estudo da microbiota vaginal/cervical tem especial interesse clínico, visto que suas alterações são motivo de elevada prevalência de queixas em ambulatórios de ginecologia. Além disso, a disbiose desta microbiota pode favorecer surgimento de infecções genitais, que por sua vez podem causar complicações em mulheres gestantes e recém-nascidos ou até mesmo desenvolver infertilidade parcial ou total, tanto em homens quanto em mulheres [20].

### **1.1.1 Microbiota na citologia cervical**

A citologia cervical é usada como método de rastreamento do câncer do colo do útero e de suas lesões precursoras [21]. Conforme as diretrizes brasileiras, os dois primeiros exames devem ser realizados com intervalo anual, e se ambos os resultados forem negativos, os próximos devem ser realizados a cada 3 anos [21]. O início da coleta deve ser aos 25 anos de idade para as mulheres que já tiveram ou têm atividade sexual [21] e os exames periódicos devem seguir até os 64 anos de idade, e naquelas mulheres sem história prévia de doença neoplásica pré-invasiva, os exames devem ser interrompidos quando essas apresentarem pelo menos dois exames negativos consecutivos nos últimos cinco anos [21].

O tipo de amostra (convencional ou em base líquida) é definido pelo método de coleta e preparo da amostra [22-25]. Na atual Nomenclatura Citológica Brasileira, a adequabilidade da amostra é definida como satisfatória ou insatisfatória [22]. É considerada insatisfatória a amostra cuja leitura esteja prejudicada por material acelular ou hipocelular (<10% do esfregaço) ou prejudicada (>75% do esfregaço) por presença de sangue, piócitos, artefatos de dessecamento, contaminantes externos ou intensa superposição celular [22]. O resultado normal da citologia é denominado “Dentro dos limites da normalidade” [22]. As alterações benignas podem ser do tipo inflamação, reparação, metaplasia imatura, atrofia e radiação [22]. As atipias celulares são divididas

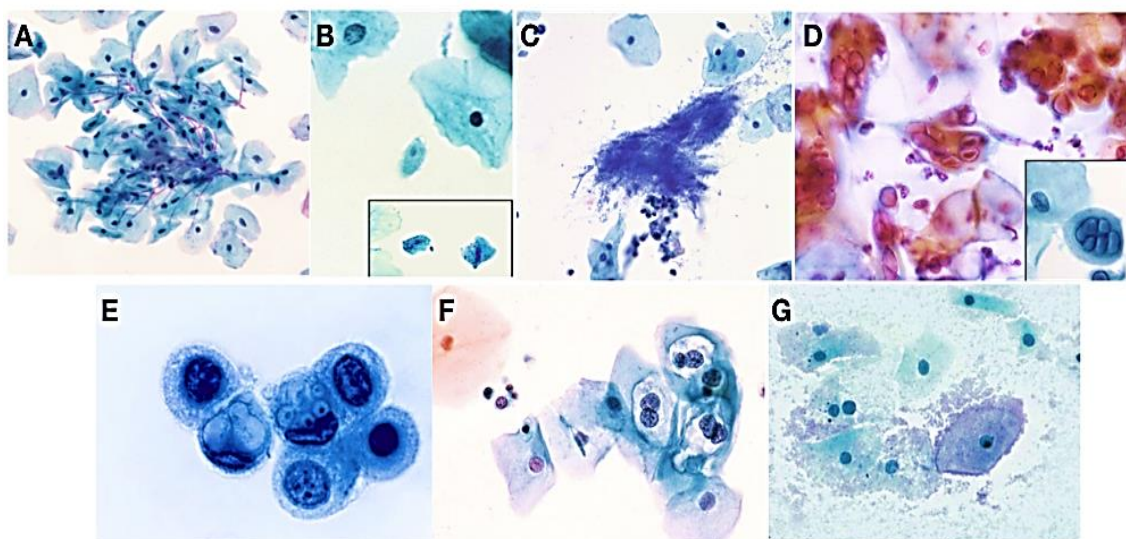
em atipias em células escamosas, atipias em células glandulares e atipias de significado indeterminado [22]. Na microbiologia, *Lactobacillus* spp., cocos e outros bacilos são considerados achados normais, pois fazem parte da microbiota normal da vagina [22] (**Figura 3**). Na ausência de sinais e sintomas, a presença desses micro-organismos não caracteriza infecção que necessite tratamento [21,22].



**Figura 3-** Citologia cervical com presença de *Lactobacillus* spp. (Bacilos de Doderlein). Células epiteliais intermediárias do epitélio estratificado vaginal, coradas pelo método de Papanicolaou. Os lactobacilos estão indicados pela seta vermelha. Fonte: adaptado de [23].

Outros tipos de micro-organismos com importância clínica podem ser identificados na citologia cervical, dentre estes: bacilos supracitoplasmáticos, *Candida* spp., *Trichomonas vaginalis* e *Actinomyces* spp. (**Figuras 4**) [23]. A expressão “bacilos supracitoplasmáticos” indica a apresentação morfológica de agentes microbianos associados a BV e que, de modo geral, respondem aos mesmos tratamentos [22].

Alterações citológicas (efeitos citopáticos) sugestivas de infecções específicas, como, por exemplo, infecção por vírus *Herpes simplex* e por *Human Papilloma virus* (HPV) também podem ser comumente identificadas (**Figura 4**). Alterações citológicas menos específicas podem estar associadas à presença de *Chlamydia trachomatis* (**Figura 4**).



**Figura 4** – Microbiota anormal da cérvix uterina. **A)** Estruturas fúngicas (pseudohifas) consistentes com *Candida* spp. **B)** Organismos com núcleo excêntrico e grânulos eosinofílicos citoplasmáticos consistentes com *Trichomonas vaginalis*. **C)** Bactérias filamentosas morfológicamente consistentes com *Actinomyces* spp. **D)** Alterações celulares (efeito citopático) consistente com infecção por vírus *Herpes simplex*, células gigantes multinucleadas, núcleos com aspecto de vidro fosco e inclusões nucleares eosinofílicas. **E)** Corpos de inclusão cocoide dentro de vacúolos na região perinuclear associados a presença de *Chlamydia trachomatis*. **F)** Alterações celulares (efeito citopático) consistente com infecção por HPV, células com halo perinuclear e binucleação. **G)** "Clue cell", cocos e bacilos, desvio de microbiota sugestivo de vaginose bacteriana. Presença de bacilos supracitoplasmáticos. Fonte: [adaptado de 23].

## 1.2 INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS (ISTs)

As ISTs podem ser causadas por vários agentes etiológicos como vírus, bactérias, fungos e protozoários, sendo a via de transmissão principal destes patógenos o contato sexual, embora, de forma eventual, a infecção possa se dar por via sanguínea [26]. A transmissão de uma IST ainda pode acontecer de forma vertical (da mãe para o bebê durante a gestação), no parto ou na amamentação [27].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulga periodicamente as incidências e prevalências globais de quatro das infecções sexualmente transmissíveis curáveis mais comuns: clamídia, gonorreia, tricomoníase e sífilis [28]. As prevalências globais mais recentes (2016) para as mulheres foram: clamídia 3,8%; gonorreia 0,9%; tricomoníase 5,3% e sífilis 0,5%. Nos homens, as prevalências foram: clamídia 2,7%; gonorreia 0,7%; tricomoníase 0,6%; e sífilis 0,5%. O total estimado de casos incidentes foi de 376,4 milhões: 127,2 milhões de casos de clamídia; 86,9 milhões de casos de gonorreia; 156,0

milhões de casos de tricomoníase; e 6,3 milhões de casos de sífilis [28], essa estimativa corresponde a uma média de pouco mais de 1 milhão de novas infecções por dia.

As estimativas de prevalência e incidência em 2016 foram semelhantes as de 2012, global e regionalmente, mostrando que infecções sexualmente transmissíveis são persistentemente endêmicas em todo o mundo. As prevalências de gonorreia, tricomoníase e sífilis foram maiores em países de baixa renda e altas estimativas de prevalência de clamídia foram divulgadas em alguns países latino-americanos [28].

As ISTs vêm sendo tratadas como problema de saúde pública mundial, devido não somente à sua elevada prevalência, mas também em decorrência de possíveis complicações advindas da ausência de diagnóstico correto e tratamento adequado; além de atuarem como porta de entrada para infecções ainda mais graves, essas infecções causam condições urogenitais agudas como cervicite, uretrite e vaginite [29,30]. Clamídia e gonorreia podem causar complicações graves a curto e longo prazo incluindo doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica e infertilidade e, além disso, também podem ser transmitidas durante a gravidez ou parto [29-31].

A sífilis pode causar doenças neurológicas, cardiovasculares e dermatológicas em adultos, parto prematuro, complicações e morte neonatal em gestantes [32]. Todas as quatro infecções estão implicadas no aumento do risco de aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) [33].

As IST mais comuns nos Estados Unidos são HPV, clamídia, tricomoníase, gonorreia, herpes genital, sífilis, HIV e Hepatite B [34,35]. Cerca de metade dos casos ocorre entre pessoas de 15 a 24 anos [34,35]. Muitos indivíduos são assintomáticos e podem transmitir inconscientemente as infecções a seus parceiros sexuais. Dessa forma, as recomendações do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (The Centers for Disease Control and Prevention, CDC) para prevenção e rastreamento de doenças sexualmente transmissíveis incluem, entre outras recomendações, o rastreamento anual de clamídia e gonorreia em todas as mulheres sexualmente ativas com menos de 25 anos, mulheres grávidas, homens que fazem sexo com homens e portadores de HIV [34,35].

### **1.2.1 ISTs no Brasil**

A prevalência das infecções sexualmente transmissíveis curáveis mais comuns (clamídia, gonorreia, tricomoníase e sífilis) tem sido estudada utilizando diferentes técnicas de biologia molecular em amostras cervicais, vaginais, anais e de urina de

pacientes em diferentes regiões do país [36-62]. Em muitos destes estudos, a prevalência é maior quando comparada com a prevalência global divulgada pela OMS. Nestes estudos, há uma variação na prevalência destas ISTs e isto se deve às diferentes técnicas de biologia molecular empregadas e às características clínicas dos pacientes. Em mulheres grávidas, há estudo mostrando uma prevalência de clamídia em 12,3% das amostras cervicais [43]. Em pacientes assintomáticas, outro estudo mostrou prevalência de clamídia em 27,8% das amostras cervicais [40]. Em pacientes inférteis, a clamídia foi detectada em 52,8% das amostras cervicais [60].

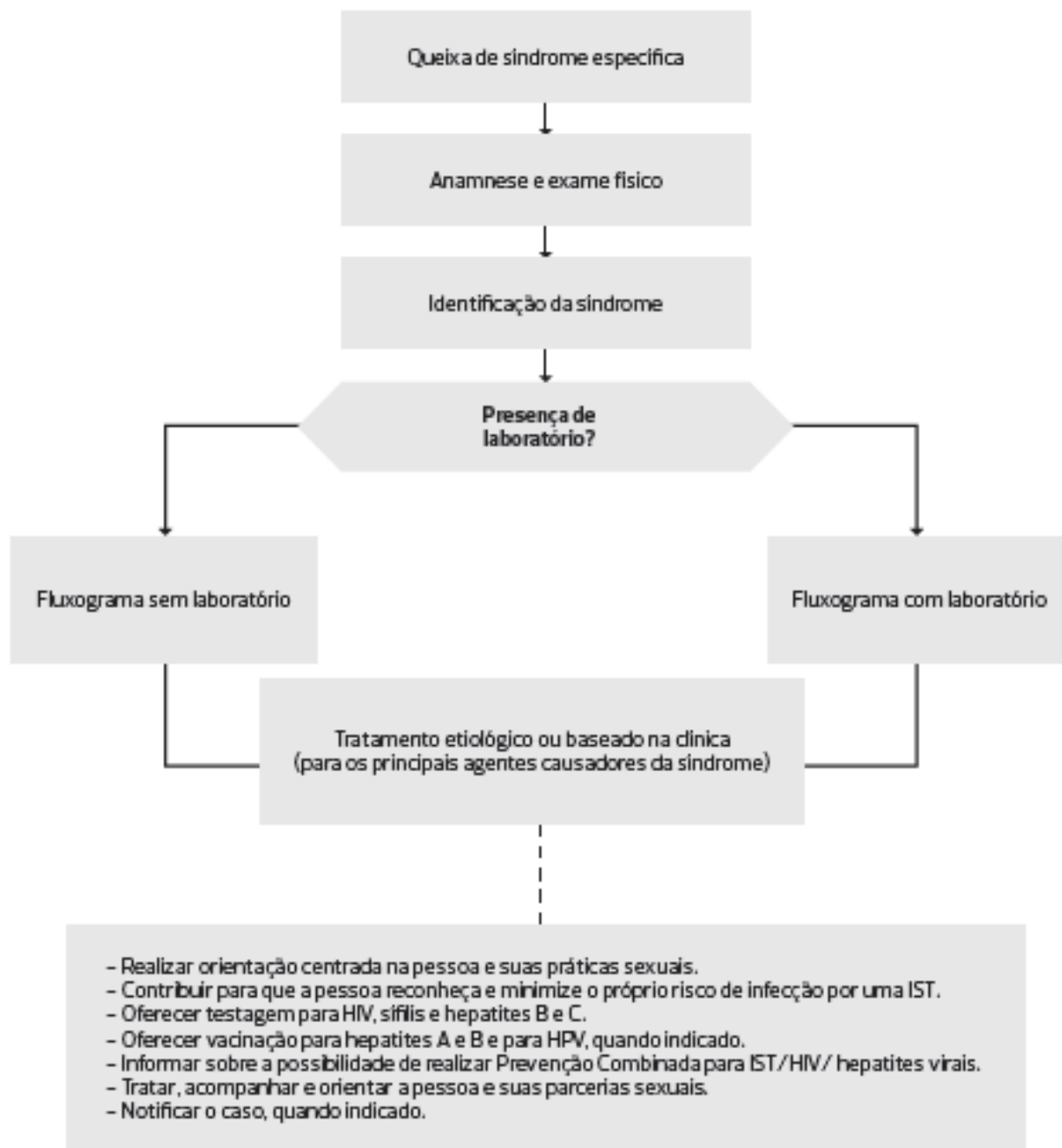
Medidas para prevenção, rastreamento e tratamento estão estabelecidas pelo Ministério da Saúde no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis [63]. Dentre as medidas de prevenção de ISTs, destacam-se a oferta de preservativo, imunização para hepatites e HPV e realização de teste sorológico e tratamento para HIV [63].

Quanto ao rastreamento de ISTs do tipo clamídia e gonorreia, em pacientes assintomáticas, as recomendações estão estabelecidas por subgrupo populacional (gestantes, por exemplo) e utilizando testes moleculares [63].

As principais manifestações clínicas das IST são corrimento vaginal, corrimento uretral, úlceras genitais e verrugas anogenitais, o corrimento vaginal ocorre principalmente na idade reprodutiva, em serviços que atendem casos de IST este é o principal sintoma referido pelas mulheres atendidas. O manejo das ISTs sintomáticas segue condutas baseadas em fluxogramas (com e sem a utilização de testes laboratoriais), conforme a **Figura 5** [63].

As principais síndromes em IST e os respectivos agentes etiológicos estão dispostos no **Quadro 1** [63].





**Figura 5.** Manejo clínico de ISTs sintomáticas. Fonte: adaptada de [63].

SÍNDROME – ÚLCERA ANOGENITAL	
Possíveis agentes etiológicos	Infecção
<i>Chlamydia trachomatis</i> (sorovars L1, L2 e L3)	Linfogranuloma venéreo (LGV)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Cancroide
Vírus do <i>Herpes simplex</i> (tipo 2)	Herpes genital <sup>a</sup>
<i>Klebsiela granulomatis</i>	Donovanose
<i>Treponema pallidum</i>	Sífilis
SÍNDROME – CORRIMENTO URETRAL/VAGINAL	
Possíveis agentes etiológicos	Infecção
<i>Candida albicans</i>	Candidíase vulvovaginal <sup>b</sup>
<i>Chlamydia trachomatis</i> (sorovars D ao K)	Clamídia
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Gonorreia
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Tricomoniase
Múltiplos agentes	Vaginose bacteriana <sup>b</sup>
SÍNDROME – VERRUGA ANOGENITAL	
Agente etiológico	Infecção
Papilomavírus humano (HPV)	Condiloma acuminado <sup>a</sup>
<i>Mycoplasma genitalium</i>	Infecção causada por micoplasma
Notas:	
<sup>a</sup> Infecções não curáveis, porém tratáveis.	
<sup>b</sup> Infecções endógenas do trato reprodutivo, que causam corrimento vaginal; não são consideradas IST.	

Fonte: DCCI/SVS/MS.

**Quadro 1** – Principais síndromes em ISTs e os respectivos agentes etiológicos. Fonte: [63].

### 1.2.2 Cervicovaginites causadas por ISTs

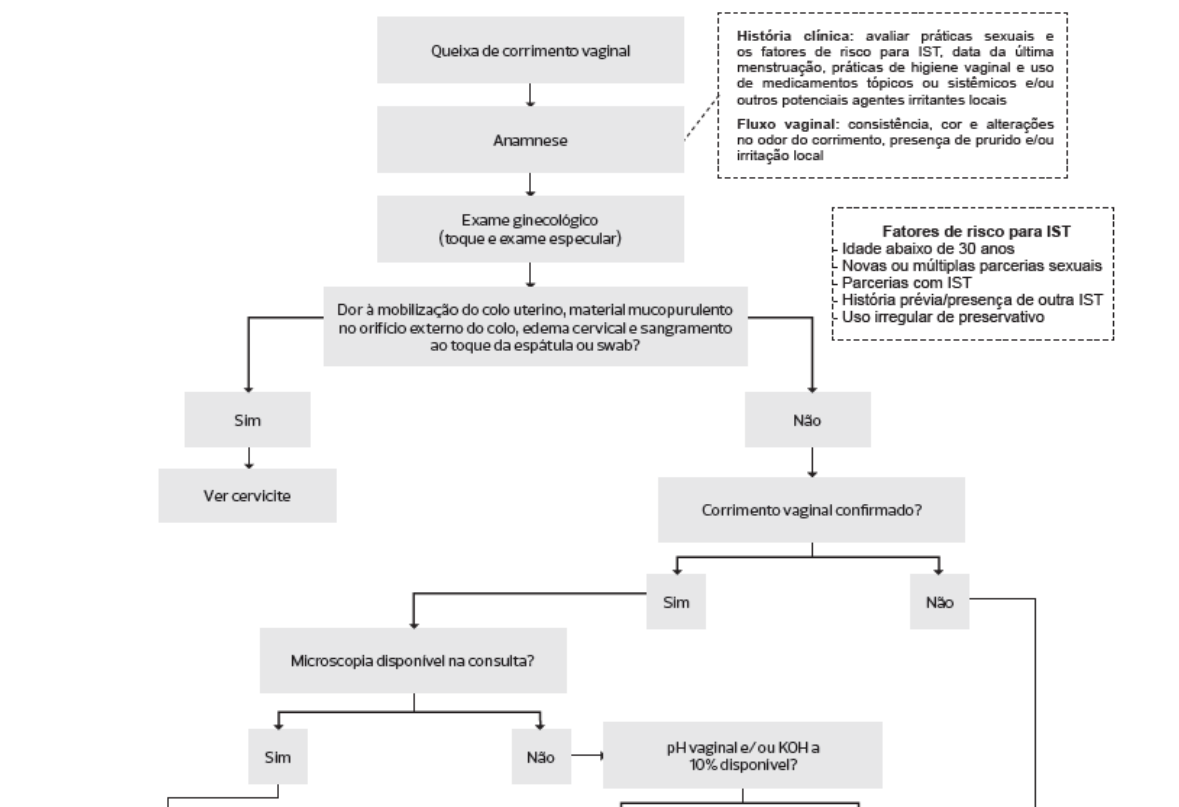
As infecções do trato genital são divididas em infecções endógenas (candidíase vulvovaginal e vaginose bacteriana); infecções iatrogênicas (infecções pós-aborto, pós-parto); e ISTs [63]. Os principais agentes etiológicos das cervicites por IST são *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* [63].

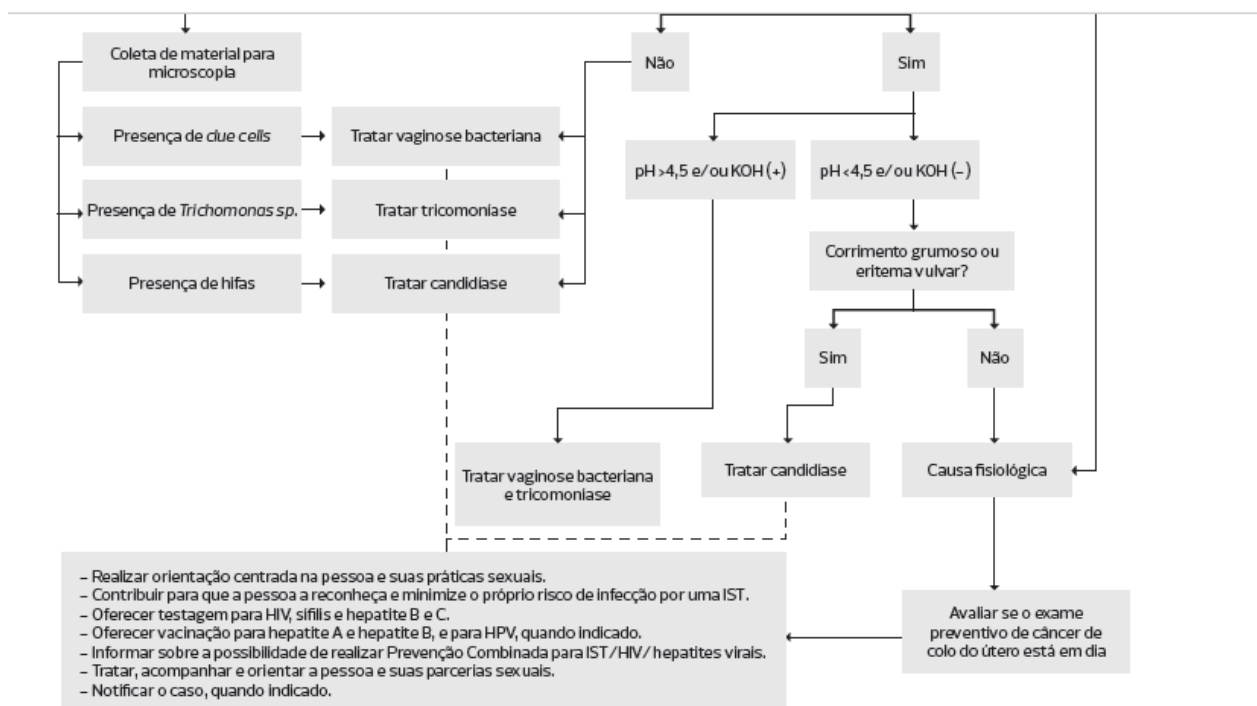
#### 1.2.2.1 Cervicites por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*

As cervicites são frequentemente assintomáticas (em torno de 70% a 80%) [63], nos casos sintomáticos as principais queixas são corrimento vaginal, sangramento intermenstrual ou pós-coito, dispareunia, disúria, polaciúria e dor pélvica crônica [63]. Ao exame físico, podem estar presentes dor à mobilização do colo uterino, material

mucopurulento no orifício externo do colo, edema cervical e sangramento ao toque da espátula ou swab [63]. As infecções por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em mulheres frequentemente não produzem corrimento vaginal, entretanto, se ao exame especular for constatada a presença de muco ou pus cervical, friabilidade do colo ou teste do cotonete positivo, a paciente deve ser tratada para gonorreia e clamídia, pois esses são os agentes etiológicos mais frequentes da cervicite mucopurulenta ou endocervicite (inflamação da mucosa endocervical) [63].

As principais complicações da cervicite por clamídia e gonorreia, quando não tratadas, incluem: dor pélvica, doença inflamatória pélvica (DIP), gravidez ectópica e infertilidade [63]. As infecções gonocócicas ou por clamídia durante a gravidez poderão estar relacionadas a partos pré-termo, ruptura prematura de membrana, perdas fetais, retardo de crescimento intrauterino e endometrite puerperal, além de conjuntivite e pneumonia do RN. Há recomendação pelo Ministério da Saúde para realização de pesquisa para *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis* por biologia molecular na primeira consulta de pré-natal [63]. O diagnóstico laboratorial da cervicite causada por *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* pode ser feito por testes de biologia molecular. Esses testes são os métodos de escolha para o diagnóstico em todos os casos, sintomáticos e assintomáticos. O fluxograma da **Figura 6** sumariza o manejo, recomendado pelo Ministério da Saúde, de pacientes com corrimento vaginal e cervical [63]. O tipo de antibioticoterapia para cervicite por *N. gonorrhoeae* é diferente do recomendado para a cervicite causada por *C. trachomatis* e depende da condição clínica da paciente [63].





**Figura 6** – Fluxograma para o manejo de corrimento vaginal e cervicite. Fonte : adaptado de [63].

### 1.2.2.2 Cervicovaginites por *Trichomonas vaginalis*

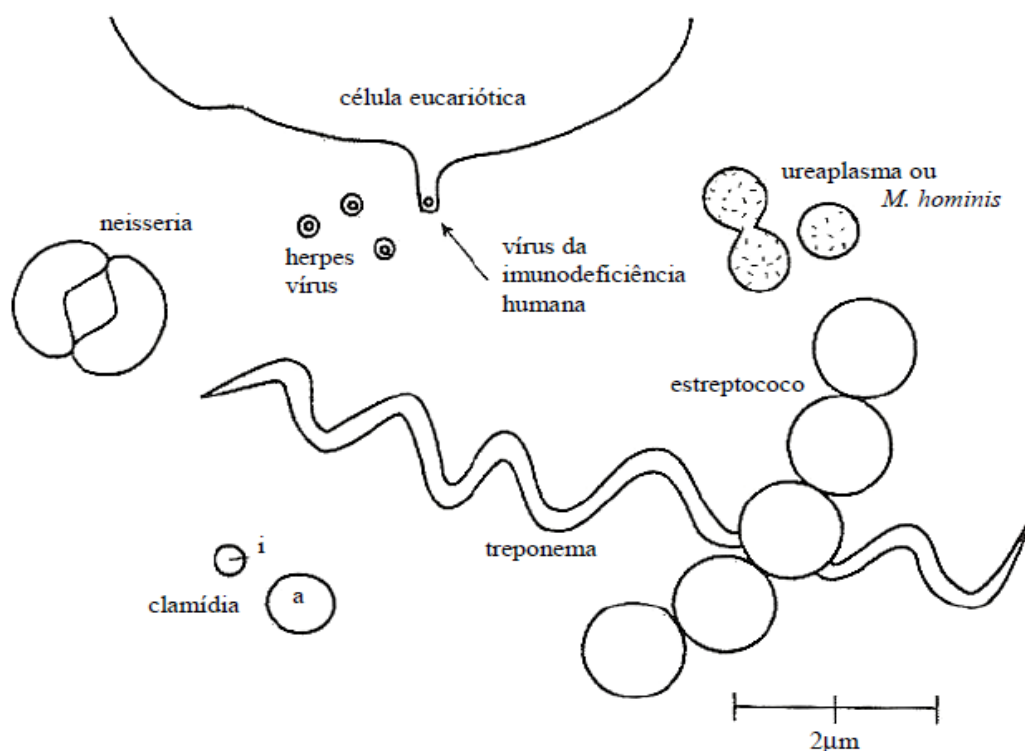
Cerca de 30% dos casos de tricomoníase são assintomáticos [63]. Os sinais e sintomas característicos consistem em corrimento vaginal intenso amarelo-esverdeado, por vezes acinzentado bolhoso e espumoso, acompanhado de odor fétido. Em caso de inflamação intensa, o corrimento aumenta e pode haver sinusiorragia e dispareunia. No exame especular, percebem-se microulcerações no colo uterino. O diagnóstico laboratorial microbiológico mais comum é o exame a fresco com observação do parasita ao microscópio, habitualmente visualiza-se o movimento do protozoário, que é flagelado, e um grande número de leucócitos. A cultura pode ser requisitada nos casos de difícil diagnóstico [63].

Não há complicações sérias para a mulher na grande maioria dos casos, mas a tricomoníase pode propiciar a transmissão de outros agentes infecciosos. Na gestação quando não tratada pode evoluir para rotura prematura das membranas. O manejo de pacientes com tricomoníase vaginal esta disposto na **Figura 6**. Na antibioticoterapia, a primeira opção (incluindo gestantes e lactantes) é Metronidazol 400mg, 5 comprimidos, via oral (VO), dose única (dose total de tratamento 2g) ou Metronidazol 250mg, 2 comprimidos, VO, 2x/dia, por 7 dias [63].

### 1.3 UREAPLASMA SPP. E MYCOPLASMA SPP. NO TRATO GENITAL

*Ureaplasma* e *Mycoplasma* compreendem dois gêneros dentro da Família *Mycoplasmataceae*, pertencente à classe *Mollicutes* [64]. Devido a classificação taxonômica dessas bactérias na família *Mycoplasmataceae*, elas são denominadas coletivamente como Micoplasmas genitais [64].

Os *Mycoplasmas* são bactérias gram-positivas caracterizadas por ausência de parede celular e por pequena quantidade de material genético sendo considerados as menores e mais simples células auto-replicantes de vida livre. *Ureaplasmas* e *M. hominis* são células cocoides de 0.2–0.3µm. **Figura 7** [65,66].



**Figura 7.** Tamanho relativo de *M. hominis* e *Ureaplasma* spp. comparado a outros microrganismos. Fonte: [67]

A maioria dos micoplasmas adere às células epiteliais do trato respiratório e urogenital, raramente invadindo tecidos, sendo assim, podem ser considerados parasitas de superfície, esta adesão às células hospedeiras é um pré-requisito para colonização e infecção. Micoplasmas humanos e animais são observados dentro de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos. Através de microscopia eletrônica, foi demonstrada a presença intracelular de *M. Genitalium* em 10% das células Vero in vitro [68].

Há pelo menos seis espécies consideradas de importância clínica, como patógenos ou oportunistas: *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma fermentans*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* [69]. No trato urogenital, as espécies relevantes são *M. genitalium*, *U. urealyticum*, *U. parvum* e *M. hominis* [70]. A separação entre as espécies de ureaplasma só é possível através de técnicas moleculares como PCR, por isso são comumente considerados como *Ureaplasma* spp.

### **1.3.1 *Mycoplasma genitalium***

*M. genitalium* é detectado em apenas 1% a 3,3% dos homens e mulheres na população em geral [71-74]. Em homens, a prevalência de *M. genitalium* com uretrite não gonocócica não clamídia (NCNGU, non-chlamydial non-gonococcal urethritis) varia de 10% a 35% [75]. Nas mulheres, vários estudos demonstraram a associação entre *M. genitalium* e uretrite, cervicite, endometrite, doença inflamatória pélvica, infertilidade, aborto espontâneo e parto prematuro [76-82].

De acordo com diretrizes europeias para ISTs, as infecções por *M. genitalium* são atualmente reconhecidas como ISTs [83]. O diagnóstico de *M. genitalium* deve ser realizado por métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) em pacientes sintomáticos e em pacientes com fatores de risco. As amostras devem ser coletadas antes do tratamento cujo início deve aguardar o resultado do teste [70]. O *M. genitalium* não apresenta parede celular; portanto, antibióticos como os betalactâmicos (incluindo penicilinas e cefalosporinas) não são eficazes.

No Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis do Ministério da Saúde, há apenas recomendações relacionadas a uretrite, para a qual consta, como tratamento de primeira escolha, o uso de Azitromicina 500mg, 2 comprimidos, VO, dose única [63].

### **1.3.2 *M. hominis*, *U. parvum* e *U. urealyticum***

*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* são frequentemente encontrados no trato urogenital humano em indivíduos saudáveis e em pacientes sintomáticos [84].

Em homens, há metanálises recentes mostrando associação de *Ureaplasma urealyticum* com uretrites e infertilidade [85,86].

A prevalência de *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* em mulheres sintomáticas e assintomáticas sexualmente ativas não grávidas, avaliada por testes moleculares variou entre 3,1-15%, 5,2-20% e 20-89 %, respectivamente [87-95]. Esta variação na prevalência provavelmente se deve às diferentes técnicas de detecção empregadas e as características da população [83].

Há poucos estudos usando testes de diagnóstico molecular sensíveis e específicos que avaliaram a associação de *M. hominis*, *U. parvum* ou *U. urealyticum* com cervicite, doença inflamatória pélvica e infertilidade. Dessa forma, não há evidências adequadas de que estas espécies estejam associadas a estas condições [83].

Não existem diretrizes internacionais baseadas em evidências para manejo de *M. hominis*, *U. parvum* e *U. urealyticum*, e faltam evidências apropriadas para regimes de tratamento eficazes [83].

O tratamento extensivo desses comensais, comumente colonizadores, com regimes antimicrobianos subótimos seleciona a resistência antimicrobiana nessas bactérias e em muitos agentes bacterianos "verdadeiros" de ISTs, bem como na microbiota geral [83]. Os testes diagnósticos e o tratamento antimicrobiano subsequente de *M. hominis*, *U. parvum* e *U. urealyticum* em alguns contextos resultam em custo econômico para a sociedade [83]. A comercialização de muitos ensaios de PCR, particularmente multiplex, que detectam múltiplos patógenos pioraram essa situação [83]. Estudos controlados e randomizados para avaliar a associação de *M. hominis*, *U. parvum* e / ou *U. urealyticum* com as síndromes e complicações de ISTs devem ser realizados. Nesses estudos recomenda-se uso de testes quantitativos de diagnóstico molecular, que investigam a carga bacteriana e permitem a distinção das espécies, uso de microscopia para avaliar a inflamação (leucócitos polimorfonucleares) e exclusão de ISTs tradicionais, como gonorreia, clamídia, tricomoníase e por *M. genitalium*, além de exclusão de AV e BV. Com base nas evidências atuais, o corpo editorial das diretrizes europeias para ISTs afirma que testes e tratamento de rotina de homens e mulheres assintomáticos ou sintomáticos para *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* não são recomendados. Embora *U. urealyticum* tenha sido associado à uretrite em homens, essa associação provavelmente não é causal, a menos que haja uma carga bacteriana alta [83]. Atualmente, também não existem diretrizes para rastrear e tratar estas bactérias na gravidez [96,97].

#### 1.4 MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DE AGENTES INFECCIOSOS EM AMOSTRAS CÉRVICO-VAGINAIS.

Dadas as limitações da microscopia e cultura para o diagnóstico de micro-organismos patogênicos, novas tecnologias moleculares foram desenvolvidas. Tecnologias moleculares são mais vantajosas por serem mais sensíveis, possibilitarem a detecção de micro-organismos pequenos e exigentes e possibilitarem a quantificação da carga microbiológica [98].

Os testes moleculares são baseados em detecção de ácidos nucleicos específicos. A técnica de reação em cadeia da enzima polimerase em tempo real (RT-PCR – *real time polymerase Chain Reaction*) tem sido empregada por muitos pesquisadores, pois a amplificação do DNA pode ser observada em tempo real, o que elimina a necessidade de análises pós-amplificação e diminui as chances de contaminação [99].

Os testes moleculares por PCR representam a primeira opção para diagnóstico e triagem de IST nos países desenvolvidos [63,70,100,101]. As vantagens dessa metodologia não estão relacionadas apenas à sua alta especificidade e sensibilidade, mas também à capacidade de identificar vários agentes etiológicos em um único teste [101-107].

A *Multiplex real-time polymerase chain reaction* (multiplex RT-PCR) é um teste de detecção molecular simultânea que pode detectar diferentes agentes em um só teste, por exemplo: *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, *Herpes Simplex Virus 1/2* e *Treponema pallidum* [108]. Através da multiplex RT-PCR, a detecção dos principais agentes infecciosos é possível com uma única amostra; com base nesta afirmação diferentes estudos apontam este exame como excelente técnica no rastreamento das IST. [109]. Comparado a métodos microscópicos para rastreamento, a multiplex RT-PCR oferece uma ferramenta mais conveniente de diagnóstico.

Estudo sobre vaginose bacteriana apontou a multiplex RT-PCR como sendo capaz de detectar e quantificar a presença de *G. vaginalis*, bem como a depleção de *Lactobacillus*, o que resultou em um diagnóstico altamente preciso [110]. Além disso, outros estudos com foco em *Candida* sp. utilizaram multiplex RT-PCR como ferramenta confirmatória e reforçaram a ideia de que não existem manifestações patognomônicas da doença e que os procedimentos laboratoriais devem ser realizados para um diagnóstico etiológico correto de vaginite [111-113].



A multiplex RT-PCR vem se mostrando como uma ferramenta de sensibilidade clínica comparável ao ensaio de PCR em tempo real mono e duplex convencional, sendo adequada para a detecção de rotina de um largo espectro dessas infecções a um custo relativamente baixo, quando comparada aos demais testes moleculares.

## 2. JUSTIFICATIVA

A estimativa da OMS de que um milhão de pessoas são infectadas todos os dias por qualquer uma das quatro infecções sexualmente transmissíveis curáveis (clamídia, gonorreia, tricomoníase e sífilis) é indiscutivelmente alarmante. As infecções sexualmente transmissíveis não identificáveis por citologia cervical apresentam graves implicações, sendo notória a necessidade de estudos empregando outros métodos para a detecção destas infecções. Neste caso, os métodos moleculares, que apresentam sensibilidade e especificidade mais eficientes se tornam uma promissora opção.

A complementação da citologia cervical com testes moleculares de diagnóstico rápido e preciso para identificação de cada agente das IST pode reduzir o tempo para se iniciar uma terapia eficaz, bem como diminuir os índices de resistência a antibióticos usados empiricamente. Um diagnóstico mais sensível e específico garante o direito ao tratamento correto, evitando-se deste modo as diversas complicações provenientes da infecção por esses micro-organismos, bem como de sua disseminação.

Apesar da crescente aplicação de métodos de diagnóstico molecular para a detecção de ISTs, os achados citológicos em amostras cervicais de pacientes com patógenos que podem ser identificados apenas por PCR e cultura microbiológica, ainda não estão bem estabelecidos. Estudos mostrando a associação da presença desses patógenos com alterações citológicas e sinais/sintomas devem ser realizados para o melhor entendimento dessas ISTs.

Deste modo, a técnica de multiplex RT-PCR proposta neste estudo possibilita identificar simultaneamente diferentes agentes infecciosos em amostras cervicais, incluindo *C. trachomatis* e as bactérias do gênero *Mycoplasma* spp. e *Ureaplasma* spp, as quais não podem ser identificados clinicamente ou por análises citológicas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever os achados na citologia cervical de pacientes infectadas com *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1- Estabelecer a frequência de infecção cervical por agentes de IST ( *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*) e por, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* através da técnica de multiplex PCR .

2- Verificar a associação da presença dos patógenos identificados por multiplex PCR com os seguintes achados da citologia cervical preparada pelo método convencional e em base líquida:

- a) microbiota bacteriana;
- b) presença de inflamação;
- c) Atipias citológicas.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 APROVAÇÃO ÉTICA E CONSENTIMENTO DOS PARTICIPANTES

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Brasília, Brasil (CAAE: 37194114.4.0000.5553). O consentimento informado para participar da pesquisa foi obtido de todas as participantes incluídas neste estudo (**ANEXO A**).

### 4.2 AMOSTRAGEM E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Trata-se de estudo observacional e transversal. A população estudada foi composta por mulheres com idade entre 23 e 54 anos que passaram por triagem de rotina entre os anos de 2017 e 2018 no serviço de ginecologia do Hospital Universitário de Brasília. Os critérios de exclusão foram: I) Idade < 18 anos, II) Uso de antibioticoterapia 12 meses antes da data da coleta de amostras, III) uso de medicamentos tópicos no mês atual e anterior ao da coleta.

### 4.3 CITOLOGIA CERVICAL

As amostras cervicais preparadas pelo método convencional foram coletadas da ectocérvice e endocérvice com espátula de Ayre e escova endocervical (cytobrush), respectivamente. As amostras foram imediatamente fixadas em álcool a 95% e coradas pelo método Papanicolaou.

As amostras em base líquida foram coletadas da endocérvice com escova endocervical que foi mergulhada em soluções fixadoras PreservCyt®. A solução foi centrifugada e o sobrenadante descartado, restando apenas 1 ml da solução com o precipitado. Cerca de 200 µL de amostra concentrada foram cito-centrifugados para cada lâmina. Duas lâminas foram coradas pelo método de Papanicolaou, as amostras foram analisadas por um patologista que desconhecia os resultados da multiplex PCR (estudo randomizado realizado às cegas). Para definição da cervicite microscópica, cinco amostras de pacientes com secreção mucopurulenta clinicamente definida por ginecologista experiente foram usadas como controles. Em preparações em base líquida, o número de leucócitos polimorfonucleares (pmnl) foi contado em pelo menos 10 campos

representativos de grande aumento (CGA) (400x) e a média mínima foi de cerca de 10 pmnl / células epiteliais. Assim, foi estabelecido como cervicite microscópica a presença de média do número de pmnl/células epiteliais superior ou igual a 10 em pelo menos 10 CGA em citologia em base líquida:  $\geq 10$  pmnl/célula epiteliais (média em 10 CGA).

Lactobacilos foram caracterizados pela presença de estruturas bacilares alongadas e cocobacilos foram caracterizados por pequenos bacilos e cocos dispostos isoladamente ou em pequenas colônias. Células escamosas individuais revestidas por cocobacilos ao longo das margens da membrana celular (bacilos supracitoplasmáticos) foram consideradas "clue cells". Foram excluídas do estudo amostras com *Candida* sp. e *Actinomyces*, e com alterações celulares consistentes com *Herpes Simplex Virus* e cytomegalovirus. Amostras com microbiota cocobacilar foram excluídas da análise comparativa da presença de inflamação em amostras com e sem patógeno.

As anormalidades citológicas foram classificadas de acordo com o sistema Bethesda atual nas seguintes categorias: I) negativo, II) células escamosas atípicas de significado indeterminado (*Atypical squamous cells of undeterminate significance - ASC-US*), III) células glandulares atípicas (CGA), IV) células escamosas atípicas, não excluindo lesões intraepiteliais de alto grau (*Atypical squamous cells cannot exclude HSIL- ASC-H*); V) lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (*Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions - LSIL*), VI) lesão intraepitelial escamosa de alto grau (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesions - HSIL*), VII) carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma in situ e VIII) adenocarcinoma invasivo [15].

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE DNA PATÓGENO

A extração de DNA de patógeno foi feita a partir de "swabs" vaginais utilizando o kit Purelink Microbiome DNA Isolation, de acordo com as instruções do fabricante (*ThermoFischer*). Os "swabs" foram aquecidos a 65°C/10min em tampão de lise, com "beads" de lise controle interno para qPCR (plasmídeo contendo sequência do citomegalovírus murino - mCMV). Imediatamente após a incubação, as amostras foram submetidas a vortex vigoroso, na horizontal, por 10 min. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em coluna provida no kit, a qual foi lavada várias vezes. O DNA foi eluído em 50µL de tampão de eluição.

#### 4.5 MULTIPLEX PCR

Reações de multiplex PCR foram feitas para detectar a presença de *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (GC), *Trichomonas vaginalis* (Tvag), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (Mhom); *Ureaplasma urealyticum* (Uurea) e *Ureaplasma parvum* (Uparv) em cada uma das amostras com uso do kit *XGen Uretrite Plus*® (ANEXO B), de acordo com o protocolo do fabricante (Mobius Life, Brazil). O kit provê as enzimas, iniciadores, sondas ligadas a fluoróforos (FAM, VIC, ROX e CY5) e controles negativos, positivos e interno, necessários para a avaliação da qualidade das reações.

##### 4.5.1 Princípio do teste

O DNA bacteriano/protozoário de diferentes patógenos é amplificado no mesmo tubo pela reação em cadeia da polimerase. A presença de uma sequência específica do patógeno na reação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir da sonda correspondente duplamente marcada, e é relatado como o valor limiar de ciclo (*Ct*) pelo termociclador em Tempo Real.

O ensaio utiliza o Citomegalovírus de Murino (mCMV) como controle de extração - Controle Interno (CI), adicionado a cada amostra e ao Controle Negativo no processo de extração.

O teste apresenta especificidade de 100% para cada micro-organismo investigado, a sensibilidade pode variar de acordo densidade celular de cada micro-organismos, conforme apresentado abaixo:

<b>Sensibilidade (LOD) CT</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) NG</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) MG</b>	10 <sup>4</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) Tvag</b>	10 <sup>2</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) Mhom</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) Uurea</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) Uparv</b>	10 <sup>2</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%

**Fonte:** Kit MULTIPLEX Plus para Detecção de Patógenos Causadores de Uretrite.

#### 4.5.2 Parâmetros para reação de multiplex PCR.

De cada amostra, foram utilizados 10 $\mu$ L para a reação de detecção simultânea de: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* e controle interno (uma sequência de citomegalovírus de camundongo).

O número máximo de 4 micro-organismos sequenciais detectados em cada tubo correlaciona-se com o número de fluoróforos identificáveis de uma única vez. O termociclador utilizado foi o *LightCycler 480 Instrument II* (Roche). Para cada placa de PCR, foram incluídos os controles negativos e positivos.

A reação foi feita com as especificações que se seguem: 42°C/15min, 94°C/3min, 40 ciclos de 94°C/8sec e 64°C/34sec, as amostras consideradas positivas tiveram Cq acima de 24.

#### 4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas, bem como a elaboração de gráficos, foram realizadas com auxílio do programa "Graphpad Prism 4" (GraphPad Software, San Diego, Califórnia). O teste de Fisher foi aplicado e a significância estatística atribuída de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 PATÓGENOS IDENTIFICADOS POR MULTIPLEX PCR.

Através do teste de multiplex PCR, a detecção de pelo menos 1 patógeno foi observada em 36,47% (17/47) das amostras e de mais de 1 patógeno em 12,76% (6/47). A frequência dos patógenos detectados está disposta na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Patógenos detectados por multiplex PCR em amostras citológicas cervicais.

	N (47)	%
<i>Ureaplasma parvum</i>	8	17,2
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	1	2,12
<i>Mycoplasma hominis</i>	4	8,51
<i>Mycoplasma genitalium</i>	0	0
<i>Chlamydia trachomatis</i>	5	10,63
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1	2,12
<i>Trichomonas vaginalis</i>	5	10,63

### 5.2 MICROBIOTA E CERVICITE MICROSCÓPICA.

Os achados na citologia cervical de acordo com o patógeno identificado por multiplex PCR estão dispostos na **Tabela 2**.



**Tabela 2.** Amostras cervicais com patógenos identificados por multiplex PCR e respectivos achados citológicos (microbiota e presença de cervicite microscópica).

Amostras	Uparv	Urea	CT	Tvag	Mhom	MG	GC	Microbiota	Cervicite
1	x							lactobacilos	x
2	x							bacilos supracitoplasmáticos	x
3	x							lactobacilos	x
4	x							lactobacilos	x
5	x							lactobacilos	x
6		x						lactobacilos	x
7			x					Cocobacilos	x
8			x					lactobacilos	x
9			x					lactobacilos	x
10				x				Cocobacilos	x
11				x				lactobacilos	x
12	x			x	x			Cocobacilos	x
13				x	x			lactobacilos	x
14				x	x			Cocobacilos	x
15	x				x			bacilos supracitoplasmáticos	
16			x				x	lactobacilos	x
17	x		x					lactobacilos	

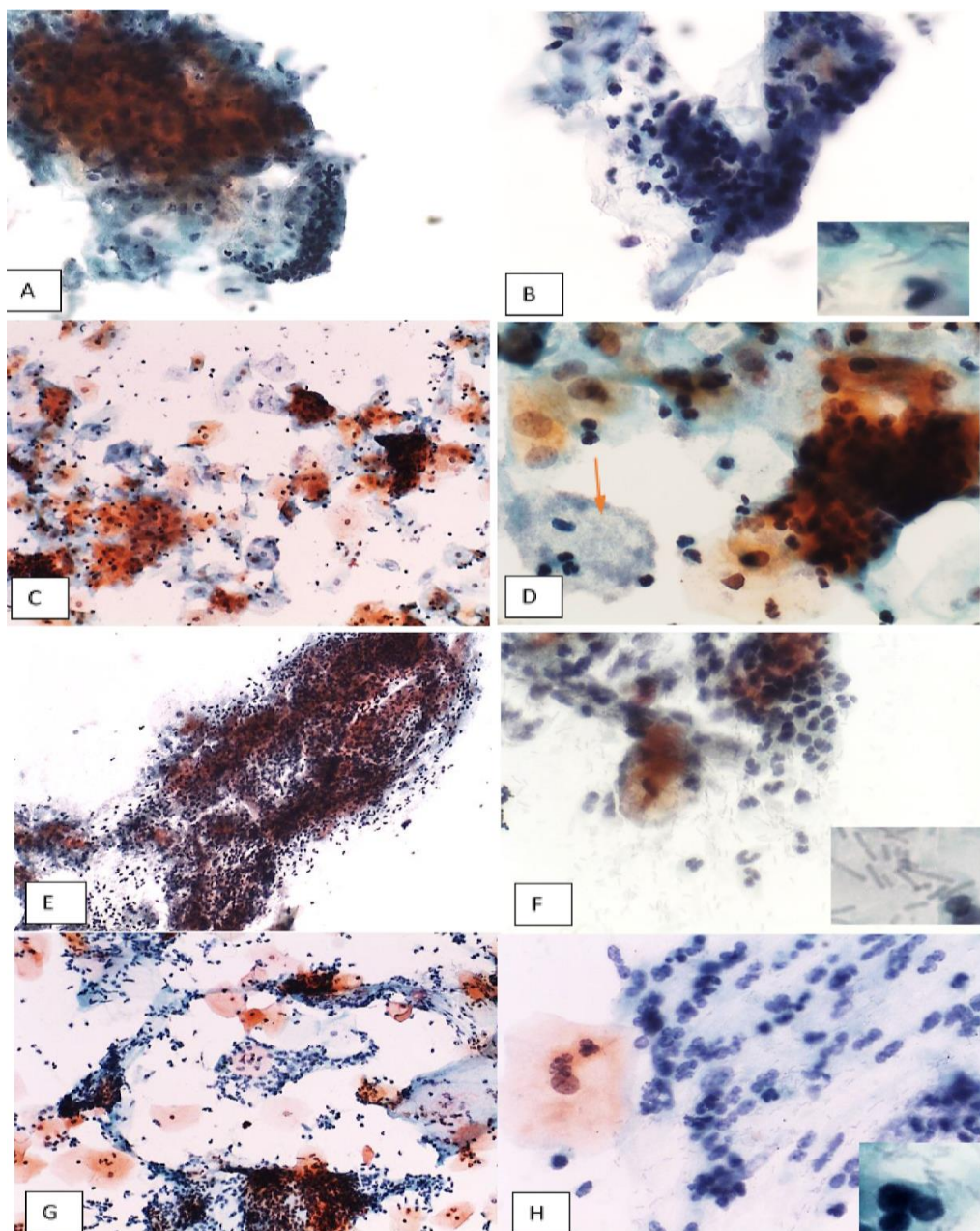
*Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (GC); *Mycoplasma genitalium* (MG); *Trichomonas vaginalis* (Tvag); *Mycoplasma hominis* (Mhom); *Ureaplasma urealyticum* (Urea) e *Ureaplasma parvum* (Uparv).

### 5.3 PATÓGENOS IDENTIFICADOS E RESPECTIVOS ACHADOS CITOLÓGICOS NA CITOLOGIA CERVICAL.

#### 5.3.1 *Ureaplasma* spp.

*Ureaplasma parvum* foi o único patógeno identificado através da multiplex PCR em cinco das amostras (amostras 1 a 5) (**Tabela 2**). Todas as amostras apresentaram cervicite microscópica ( $\geq 10$  pmnl / célula epitelial). Foram observados numerosos

leucócitos polimorfonucleares (pmnl) em muco, isolados ou em agregados (“polyballs”) (**Figura 8**). Com relação a microbiota destas amostras, pode-se observar que houve predomínio de lactobacilos em 4 amostras e 1 amostra com bacilos supracitoplasmáticos (“clue cells”) (**Tabela 2; Figura 8**). Alterações celulares reativas-reparativas, que estão associadas à inflamação, também foram observadas.

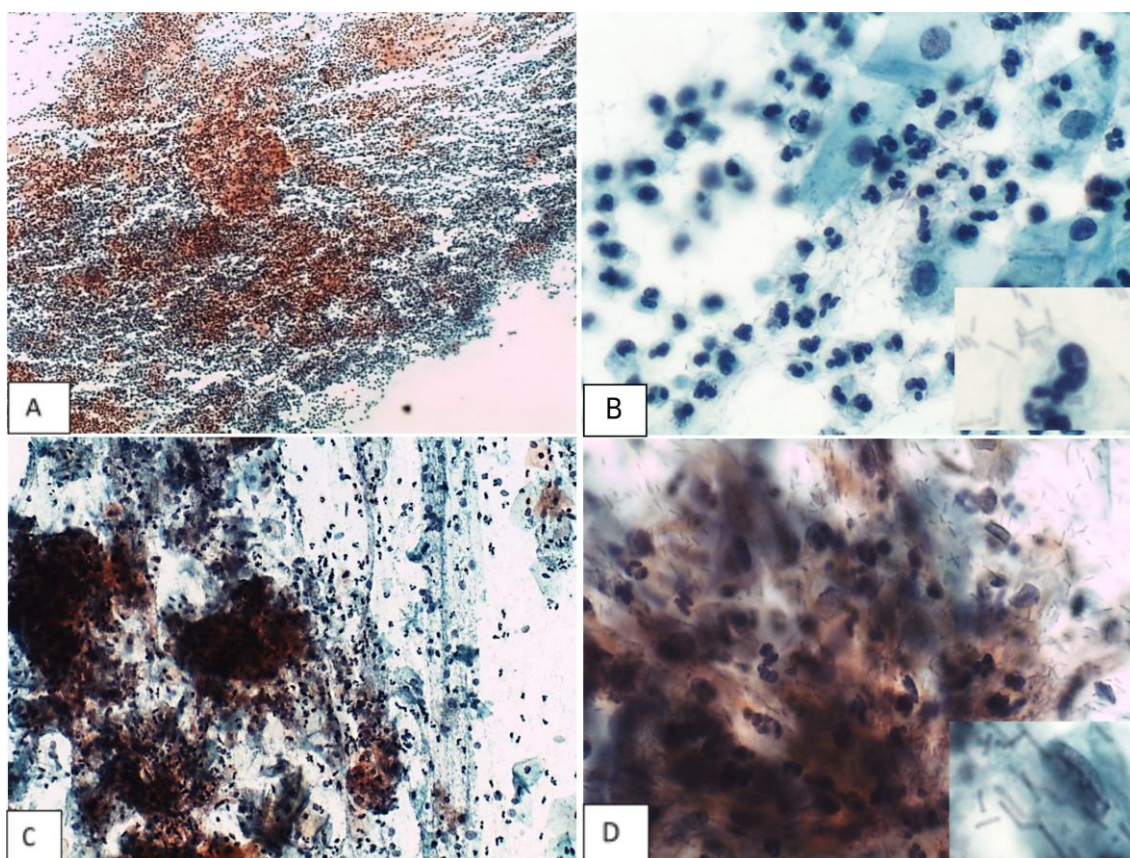


**Figura 8.** Citologia cervical de amostras em que o *Ureaplasma* foi o único patógeno detectado por multiplex PCR. *Ureaplasma parvum* em A-F. *Ureaplasma urealyticum* em G, H. Numerosos polimorfonucleares isolados e agregados (“polyballs”) (A-H). Microbiota normal (lactobacilos) em B, F, H (canto inferior direito). Bacilos supracitoplasmáticos (“clue cell”) em D (seta laranja). Papanicolaou. A, C (200x); B, D, F, H (400x); E, G (100X); canto inferior direito (1000X). Citologia em base líquida A-D, G, H; Citologia convencional E, F. Amostra 4 (A e B); amostra 2 (C e D); amostra 5 (E e F) e amostra 6 (G e H).

### 5.3.2 *Chlamydia trachomatis*

Nas amostras 7, 8 e 9 detectou-se apenas *C. trachomatis* (**Tabela 2**). Todas as amostras apresentaram cervicite microscópica com numerosos leucócitos polimorfonucleares em muco, isolados ou em agregados (**Figura 9**). A microbiota em 2 amostras foi predominantemente lactobacilar, enquanto em uma amostra a predominância observada foi de cocobacilos (**Tabela 2; Figura 9**).

Verificou-se também alterações celulares reativas-reparativas associadas à inflamação.



**Figura 9.** Citologia cervical de amostras em que *Chlamydia trachomatis* foi o único patógeno detectado por multiplex PCR. Numerosos polimorfonucleares isolados e em agregados ("polyballs"). Microbiota normal (lactobacilos) em **B, D** (canto inferior direito). Papanicolaou. **A** (40x); **B, D** (400x); **C** (100X); canto inferior direito (1000X). **A-D**, citologia convencional. Amostra 8 (**A e B**) e amostra 9 (**C e D**).

### 5.3.3 *Trichomonas vaginalis*

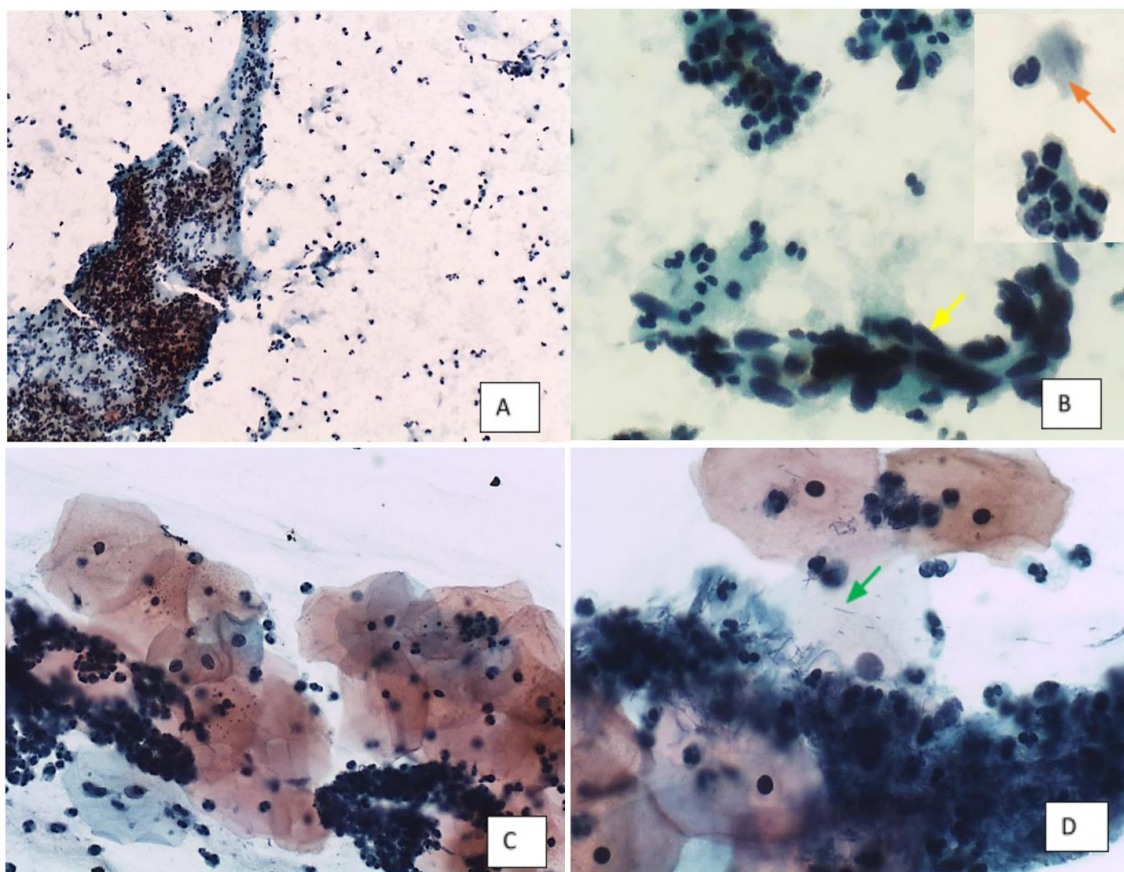
Nas amostras 10 e 11 o único patógeno detectado por multiplex PCR foi o protozoário *Trichomonas vaginalis* (**Tabela 2**). Ambas as amostras apresentaram



cervicite microscópica com numerosos leucócitos polimorfonucleares em muco, isolados ou em agregados (**Tabela 2; Figura 10**). A microbiota foi predominantemente cocobacilar em uma amostra e normal (predominantemente lactobacilar) em outra (**Tabela 2**).

Somente na amostra 10, organismos em forma de pêra com núcleo localizado excentricamente e grânulos citoplasmáticos eosinofílicos consistentes com características morfológicas de *Trichomonas vaginalis* estavam presentes (**Figura 10 B**); ainda na amostra 10, pode-se observar alteração celular compatível com lesão intraepitelial de alto grau (**Figura 10 B**).

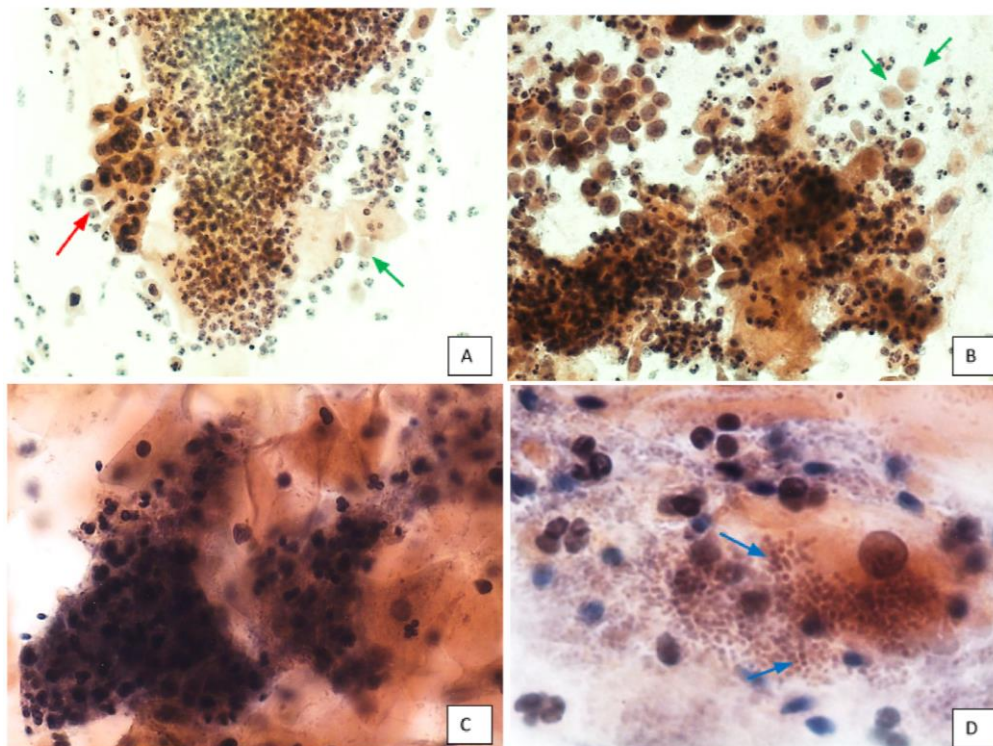
Similarmente ao que foi descrito nas infecções descritas acima, alterações celulares reativas-reparativas que estão associadas à inflamação também estavam presentes nestas amostras.



**Figura 10.** Citologia cervical de amostras em que *Trichomonas vaginalis* foi o único patógeno detectado por multiplex PCR. Numerosos leucócitos polimorfonucleares, isolados e em agregados ("polyballs") em **A-D**. **B** - Organismos em forma de pêra com núcleo localizado excentricamente e grânulos citoplasmáticos eosinofílicos, consistentes com *T. vaginalis* (seta laranja no canto superior direito). Microbiota normal (lactobacilos) (seta verde) em **D**; HSIL em **B** (seta amarela). Papanicolaou. **A** (100x); **B, D** (400x); **C** (200x); canto superior direito (1000x). **A e B**, citologia em base líquida; **C e D**, citologia convencional. Amostra 10 (A e B), amostra 11 (C e D).

### 5.3.4 Múltiplos patógenos

*Mycoplasma hominis* foi detectado simultaneamente com *Trichomonas vaginalis* nas amostras 13 e 14, com *U. parvum* na amostra 15 e com ambos os patógenos na amostra 12 (**Tabela 2**). Nas amostras 12, 13 e 14, os achados foram semelhantes aos das amostras em que *Trichomonas* foi o único patógeno isolado: cervicite microscópica com numerosos leucócitos polimorfonucleares em muco, isolados ou em agregados (**Figura 11**), além disso, a microbiota era predominantemente cocobacilar nas amostras 12 e 14 e predominantemente lactobacilar na amostra 13 (**Tabela 2**) (**Figura 11**). Somente na amostra 14, organismos em forma de pêra com núcleo localizado excentricamente e grânulos citoplasmáticos eosinofílicos, consistentes com *T. vaginalis* estavam presentes (**Figura 11 A-B**). Ainda na amostra 14, alterações celulares compatíveis com lesão do tipo *HSIL* foram observadas (**Figura 11 A-B**). *M. hominis* e *U. parvum* foram detectados simultaneamente na amostra 15. Não foi observada cervicite microscópica e a microbiota foi de bacilos supracitoplasmáticos ("clue cells").



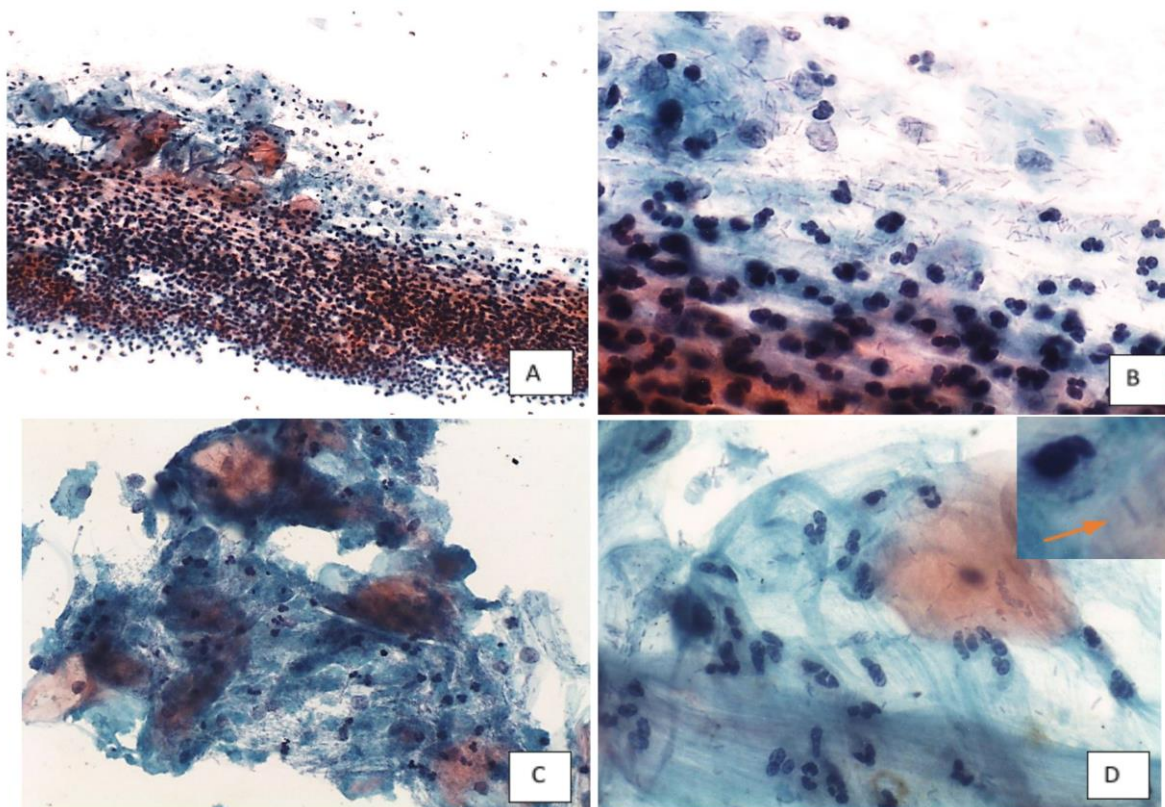
**Figura 11.** Citologia cervical de amostras com múltiplos patógenos identificados por multiplex PCR. **A e B**, *M. hominis* e *T. vaginalis* (amostra 14); **C e D** *M. hominis*, *T. vaginalis* e *U. parvum* (amostra 12). Numerosos leucócitos polimorfonucleares, isolados e em agregados ("polyballs") em **A-D**. Organismos em forma de pêra com núcleo localizado excentricamente e eosinofílica grânulos citoplasmáticos, consistentes com *T.*



*vaginalis* (seta verde) em **A, B**. Microbiota cocobacilar (seta azul). HSIL em **A** (seta vermelha). Papanicolaou: **A, B** (200x); **C** (400x); **D** (1000X). **A, B, C** e **D**, citologia convencional.

*N. gonorrhoeae* foi detectada em apenas uma amostra (amostra 16) concomitantemente com *C. trachomatis* (**Tabela 2; Figura 12**); os achados citológicos foram semelhantes aos das amostras em que *C. trachomatis* foi o único patógeno detectado: cervicite microscópica com numerosos leucócitos polimorfonucleares em muco e isolados.

Os leucócitos polimorfonucleares foram mais bem distribuídos e menos abundantes na preparação em base líquida (**Figura 12 C, D**) comparada com a convencional (**Figura 12 A, B**), a microbiota era predominantemente lactobacilar (**Tabela 2, Figura 12**).



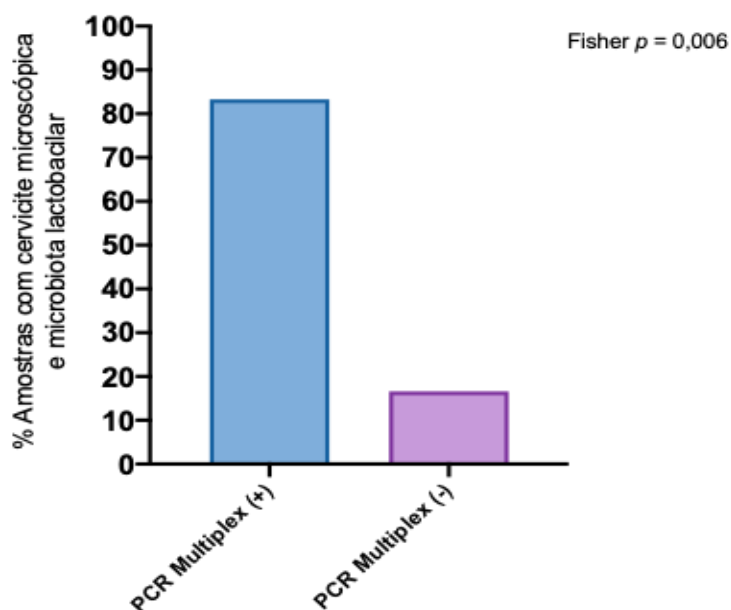
**Figura 12.** Citologia cervical da amostra 16 com múltiplos patógenos (*C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae*) detectados por multiplex PCR. Citologia convencional **A** e **B**; Citologia de base líquida **C** e **D**. **A-D**, numerosos leucócitos polimorfonucleares no muco. Os leucócitos polimorfonucleares foram mais bem distribuídos e menos abundantes na base líquida (**C, D**) do que na preparação convencional (**A, B**). A microbiota normal (lactobacilos) foi mais abundante na preparação convencional (**B**). **D**, lactobacilos (canto superior direito, seta laranja). Papanicolaou, **A** (100x); **B** e **D** (400x); **C** (200x); Canto superior direito (1000x).

Na amostra com *C. trachomatis* e *Ureaplasma parvum* (amostra 17), não foi observada cervicite microscópica e a microbiota era predominantemente lactobacilar.

#### 5.4 COMPARAÇÃO ENTRE AMOSTRAS COM E SEM PATÓGENO DETECTADO POR MULTIPLEX PCR.

Nas amostras em que pelo menos um patógeno foi identificado por multiplex PCR, cervicite microscópica foi observada em 88,23 % (15/17) do total de amostras e em 90,90% (10/11) das amostras com microbiota normal (predominantemente lactobacilar) (**Tabela 2**).

Nas amostras em que nenhum patógeno foi detectado por multiplex PCR, cervicite microscópica foi observada em 46,66% (14/30) do total de amostras e em 25% (2/8) das amostras em que a microbiota foi normal (predominantemente lactobacilar) (**Tabela 3 - APÊNDICE A**). Dentre as amostras com cervicite microscópica e microbiota normal (lactobacilar), aquelas com pelo menos um patógeno identificado por multiplex PCR foram significativamente mais frequentes do que aquelas sem patógeno, 83,3% contra 16,6% (teste de Fisher  $p = 0,006$ ) (**Figura 13**).



**Figura 13:** Frequência de cervicite microscópica entre amostras com microbiota normal com e sem patógeno detectado por Multiplex PCR.

## 6. DISCUSSÃO

As ISTs frequentemente podem ser causadas por infecções polimicrobianas, deste modo, métodos capazes de detectar múltiplos patógenos em uma única amostra se tornam cada vez mais necessários [114-116].

Diferentes tipos de amostras como efusões, lavado peritoneal, lavado broncoalveolar, urina e as obtidas por PAAF, podem ser utilizadas não apenas para análise citológica, mas também para detecção de patógenos [117]. Com amostras cervicais para preparações em base líquida, além da citologia, diferentes técnicas de biologia molecular podem ser aplicadas para detectar patógenos como o vírus HPV, bem como outros micro-organismos patogênicos sexualmente transmissíveis [117].

No presente estudo, amostras cervicais foram coletadas para análise citológica e pela técnica de multiplex PCR, com sondas específicas para amplificação dos patógenos *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*.

### 6.1 FREQUÊNCIA DOS PATÓGENOS.

A multiplex PCR foi positiva em 36,47% das amostras avaliadas neste estudo. *U. parvum* foi o patógeno mais comumente detectado (17,02%), seguido por *C. trachomatis* (10,63%), *T. vaginalis* (10,63%), *M. hominis* (8,51%), *U. urealyticum* (2,12%) e *N. gonorrhoeae* (2,12%). *M. genitalium* não foi detectado em nenhuma das amostras e múltiplos patógenos foram observados em 12,76% do total das amostras.

Há uma variação na prevalência desses patógenos em amostras cervicais analisadas em estudos anteriores. Esta variação, muito provavelmente, se deve ao tipo de população estudada e ao método de detecção empregado.

Em um estudo anterior, que usou multiplex PCR para detectar os mesmos patógenos em amostras de mulheres jovens sexualmente ativas de Israel, 44,6% das amostras eram positivas para pelo menos um patógeno. *U. parvum* foi identificado em 28,2% das amostras, seguido por *U. urealyticum* 15,7%; *C. trachomatis* 6,6%, *M. hominis* 6,2%; *M. genitalium* 1,9%; *N. gonorrhoeae* 0,7% e *T. vaginalis* 0,5% [118]. Altos índices de coinfeção de *C. trachomatis* e *M. genitalium* (4,1%) e baixos índices (cerca de 0,5%) de coinfeção de *C. trachomatis* e *N. gonorrhoeae* e de *C. trachomatis* e *T. Vaginalis* foram observados neste estudo prévio. De maneira geral, neste estudo prévio, 9% dos



casos foram positivos para pelo menos uma das ISTs “verdadeiras” (causadas por *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *N. gonorrhoeae* e *T. Vaginalis*)[118]. As taxas de positividade das ISTs “equivocas” (causadas por *U. Parvum*, *U. urealyticum* e *M. hominis*) foram duas a cinco vezes maiores, principalmente em mulheres.

Em um estudo brasileiro, no qual multiplex PCR foi usada para detectar o papilomavírus humano (HPV) e ISTs em amostras cervicais de mulheres assintomáticas, observou-se uma elevada frequência, principalmente de HPV (46,8%), *M. genitalium* (28,6%) e *C. trachomatis* (27,8%). Entre 126 pacientes, 66% eram infectadas com pelo menos uma IST e algumas foram infectadas simultaneamente por 2, 3 e até 4 patógenos [119].

Diante destas elevadas frequências e potenciais complicações decorrentes destas ISTs, diretrizes americanas e europeias e o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com IST do Ministério da Saúde do Brasil recomendam rastreamento para as ISTs “verdadeiras” (causadas por *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *N. gonorrhoeae* e *T. Vaginalis*) em pacientes jovens e/ou pacientes em grupos de risco [63,70,120].

Similarmente ao resultado observado no presente estudo, há vários estudos prévios mostrando elevada prevalência de Mycoplasmas/Ureaplasmas em amostras cervicais, principalmente de *U. parvum* [121,122]. Contudo, as complicações decorrentes desta infecção/colonização do trato reprodutivo feminino ainda não estão bem estabelecidas. Nas análises de Zanotta et al., (2019), em que o método de detecção empregado foi a multiplex PCR, os patógenos mais prevalentes em mulheres sexualmente ativas e sintomáticas foram Mycoplasmas/Ureaplasmas. A prevalência geral foi de 36,5% (236/646), sendo *M. genitalium* em 1,2%, *M. hominis* em 11,8%, *U. urealyticum* em 11,0% e *U. parvum* em 87,7%. Neste estudo prévio, não foi encontrada associação entre infecção por Micoplasma / Ureaplasma e queixas cervicais / vaginais. Entretanto, a presença de *U. parvum* esteve associada significativamente à presença de outras DSTs e observou-se uma associação significativa entre a alta carga de *U. parvum* e a presença de infecção por tipos de HPV de alto risco.

## 6.2 CITOLOGIA-CERVICITE.

Em relação à citologia, os achados do presente estudo foram descritos na preparação convencional e em base líquida, em geral, comparando os dois métodos

utilizados, nas preparações pelo método convencional, o número de leucócitos polimorfonucleares foi maior e a microbiota foi mais abundante. Para aplicar o critério de cervicite microscópica e para analisar a associação da cervicite microscópica com a presença de patógeno apenas a preparação em base líquida foi utilizada, visto que as amostras usadas neste método de preparo foram as mesmas utilizadas para a detecção de patógenos pela técnica de multiplex PCR, além disso, a distribuição mais regular de células na lâmina, em comparação com a citologia preparada pelo método convencional, facilita a quantificação. A citologia em meio ou base líquida é aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) para uso em amostras ginecológicas e de outras especialidades, a técnica se baseia na inserção da amostra em meio fixador e obtenção de uma lâmina com fundo mais limpo, sem superposições de células, o que se deve ao sistema de filtros. As vantagens da citologia em base líquida em relação a citologia preparada pelo método convencional são: maior sensibilidade, menos artefatos técnicos e possibilidade de testes histoquímicos e de biologia molecular [123-125].

O critério para cervicite microscópica ( $\geq 10$  pmnl / célula epitelial) foi estabelecido em amostras com diagnóstico clínico de secreção cervical mucopurulenta, não há critérios bem definidos para cervicite em exames de citologia cervical, ainda mais como preditor da presença de patógenos. Em um estudo anterior com preparações em base líquida, os autores concluíram que usando um limiar de  $\geq 2$  leucócitos por célula epitelial por campo de grande aumento os valores preditivos positivos para *M. genitalium*, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis* foram 100, 70, 67 e 20%, respectivamente [126]. O baixo limiar usado neste estudo anterior explicaria o baixo valor preditivo positivo do método para *T. vaginalis*, que geralmente causa exsudato inflamatório intenso na mucosa cervical (cervicite purulenta).

Em amostras com pelo menos um patógeno detectado por multiplex PCR, a cervicite microscópica ( $\geq 10$  pmnl / célula epitelial) estava presente em 88,23% do total e em 90,9% das amostras com microbiota normal (lactobacilar). A cervicite microscópica estava presente em todas as amostras em que *U. parvum*, *C. trachomatis* e *T. vaginalis* foram os únicos patógenos detectados. Vale ressaltar que uma das limitações deste estudo foi não conseguir apresentar os achados citológicos de *M. hominis*, *M. genitalium* e *N. gonorrhoeae* quando estes são os únicos patógenos detectados.

A cervicite microscópica não foi observada em 2 amostras com infecção múltipla, na amostra 15 (*U. parvum* e *M. hominis*) e na 17 (*U. parvum* e *C. trachomatis*), com base neste resultado, fica evidente a importância de correlacionar os resultados da PCR com

os resultados da citologia cervical, e com achados clínicos. O valor preditivo negativo da microscopia tende a ser elevado, pois sem exsudato polimorfonuclear ou com exsudato escasso, provavelmente, não há cervicite microscópica ou clínica [127].

Amostras com cervicite microscópica ( $\geq 10$  pmnl / célula epitelial) e microbiota normal (lactobacilar) foram comparadas quanto à presença de patógenos e os resultados mostraram que a cervicite microscópica era significativamente mais frequente quando pelo menos um patógeno era identificado por multiplex PCR. Em duas das amostras em que nenhum patógeno foi detectado houve cervicite microscópica; nesses dois casos a inflamação pode ter sido causada por um agente não infeccioso, por agente infeccioso não detectado pelo teste usado no presente estudo ou pode indicar uma limitação na sensibilidade deste teste. De acordo com o fabricante do kit multiplex PCR utilizado neste estudo, a sensibilidade é variável para cada patógeno:  $10^2$  cópias/mL (*U. parvum* e *T. vaginalis*),  $10^3$  cópias/mL (*C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e *M. hominis*) e  $10^4$  cópias/mL (*M. genitalium*); a menor sensibilidade para *M. genitalium* pode ser uma das razões para a não detecção deste patógeno nas amostras do presente estudo.

Na rotina diagnóstica, o achado de inflamação com exsudato neutrofílico intenso, e microbiota normal é frequente, alguns destes esfregaços citológicos chegam a ser categorizados como insatisfatórios pelo número elevado de piócitos. Os resultados do presente estudo sugerem que possivelmente a causa da inflamação intensa esteja relacionada à presença de algum patógeno que poderia ser identificado apenas por testes moleculares ou cultura e não por microscopia.

De acordo com o sistema Bethesda, em laudos de citologia cervical a descrição de organismos e de outros achados não neoplásicos é opcional. Os resultados do presente estudo sugerem que a intensidade da inflamação deve sim ser mencionada para que esta possa ser correlacionada com os dados clínicos e os resultados da PCR.

### 6.3 CITOLOGIA- MICROBIOTA.

Em relação à microbiota, em amostras com pelo menos um patógeno detectado por multiplex PCR, a microbiota normal (lactobacilar) foi a mais frequente (64,70%) seguida pelos cocobacilos. Vale ressaltar que amostras com potenciais agentes inflamatórios como *Candida* sp. e *Actinomyces* e com efeitos citopáticos consistentes com Herpes e citomegalovírus foram excluídas deste estudo, pois esses patógenos também podem ser a causa de alterações citológicas reativas/reparativas e inflamação. A

presença desses micro-organismos não permitiria a análise da associação entre cervicite microscópica e a presença de patógenos identificados por multiplex PCR. Da mesma forma, apenas as amostras com microbiota normal (lactobacilar) foram utilizadas na análise da associação entre cervicite microscópica e presença de pelo menos um patógeno na multiplex PCR, pois existem vários estudos mostrando que as microbiotas cocobacilares, principalmente aquelas com bactérias aeróbias podem estar associadas à presença de inflamação [128,129].

*T. vaginalis* foi identificado na citologia em apenas em 3/5 das amostras das amostras em que o patógeno foi detectado por PCR, esperava-se essa discordância entre citologia e multiplex PCR para a identificação desse patógeno, uma vez que técnicas moleculares são mais sensíveis que a microscopia para detecção de *T. vaginalis* [130]. Discute-se que a prevalência global de *T. Vaginalis* pode estar subestimada, pois muitos dados são derivados de estudos que usaram microscopia em vez de testes de amplificação de ácidos nucleicos sensíveis [28].

Curiosamente, nas amostras 12, 13 e 14, nas quais *T. vaginalis* foi identificado, observou-se co-infecção com *M. hominis*. Este mesmo padrão de co-infecção foi observado em outro estudo aplicando a técnica de multiplex PCR [131]. Neste estudo prévio, associação de *T. Vaginalis* com *M. hominis* foi observada em 25% das amostras em que *T. Vaginalis* foi detectado [131].

Na amostra com *N. gonorrhoeae*, a microbiota foi normal (predominantemente lactobacilar) e não foram evidenciados diplococos. A identificação de espécies de *Ureaplasma* e *Mycoplasma* e de *C. trachomatis* não era esperada na citologia. Os *Ureaplasmas* são bactérias de forma cocobacilar, com diâmetros entre 0,2 e 0,3 µm e a falta de uma parede celular rígida torna quase impossível visualizá-las diretamente por microscopia óptica [65,66]. Da mesma forma, a identificação da *C. trachomatis* na citologia cervical é difícil já que o corpo elementar (EB), que é a forma extracelular de *C. trachomatis*, possui um diâmetro de apenas 0,3 µm [132], as clamídias alternam entre duas formas morfológicamente distintas, um corpo elementar (EB, elementary body) não replicativo infeccioso e um corpo reticulado (RB, reticulate body) replicativo não infeccioso. Após a adesão e internalização nas células hospedeiras, os EBs percebem rapidamente a mudança no ambiente e respondem a isso iniciando a diferenciação em RBs, dentro de uma inclusão citoplasmática, o corpo reticulado (RB) se divide repetidamente no corpo infeccioso elementar (EB), após a morte da célula hospedeira, apenas a forma EB da bactéria sobrevive e continua a infectar outras células [133].

#### 6.4 CITOLOGIA –ATIPIAS CELULARES.

Além das características relacionadas à inflamação e microbiota, em 2 amostras em que *T. vaginalis* foi detectado, lesão do tipo intraepitelial escamosa de alto grau (*High-grade Squamous Intraepithelial Lesions – HSIL*) também foi identificada. A associação de patógenos de ISTs com infecção por HPV e anormalidades citológicas tem sido descrita na literatura [134,135], essa associação é outro forte indicador da importância da triagem de pacientes por meio de métodos de diagnóstico como o exame de Papanicolaou, que apesar de ser considerado apenas preditor da presença de patógenos, são mais acessíveis, principalmente em países menos desenvolvidos.

#### 6.5 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.

A principal limitação deste estudo é o número reduzido de amostras, como consequência não foi possível concluir sobre a prevalência dos patógenos estudados, além disto, nenhuma amostra com *M. genitalium* foi detectada e não foi possível descrever os achados citológicos de amostras em que os patógenos *M. hominis*, *M. genitalium* e *N. gonorrhoeae* são os únicos patógenos detectados.

Outra limitação deste estudo foi a não utilização de kits para detecção de *T. pallidum*, já que a sífilis é considerada uma das principais causas de ISTs no Brasil. Teste para detecção de HPV também não foi realizado, impossibilitando a análise de associação da presença destas ISTs com a presença do HPV. Coilocitos, células com efeito citopático causado pelo HPV, não foram observados nas amostras analisadas neste estudo, contudo, considerando que a maioria das lesões intraepiteliais estão associadas ao HPV, pode-se dizer que, pelo menos em 2 amostras deste estudo, o HPV estava presente.

Outro aspecto importante não avaliado no presente estudo foi a quantificação das bactérias, pesquisadores sugerem que altas cargas de *Ureaplasma* estejam correlacionadas com a presença de cervicite e uretrite [136,137].

Apesar de não estar entre os objetivos deste estudo, é importante ressaltar que a associação dos dados laboratoriais (citologia e biologia molecular) com os dados clínicos é fundamental para o melhor entendimento das repercussões clínicas das ISTs, essa análise de associação não foi realizada neste estudo porque as amostras foram coletadas

por diferentes ginecologistas, assim, para evitar um possível viés de interpretação clínica optou-se por não considerar os dados clínicos obtidos.

## 6.6 PERSPECTIVAS

Apesar das limitações discutidas acima, os resultados do presente estudo indicam a necessidade de mais pesquisas com testes moleculares para avaliar a prevalência de ISTs no Brasil e prevalência de bactérias urogenitais, principalmente *Ureaplasma* e *Mycoplasma*. Ainda neste sentido são necessários estudos de associação entre os achados laboratoriais de citologia e biologia molecular com dados clínicos (sinais e sintomas das pacientes) e possíveis complicações e sequelas clínicas associadas à presença destas ISTs.

## 7. CONCLUSÃO

Uma elevada frequência de patógenos sexualmente transmissíveis, principalmente de *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis* e *Ureaplasma parvum* pode ser detectada em amostras cervicais por multiplex PCR.

Os achados citológicos são inespecíficos e caracterizados por inflamação intensa e microbiota normal (predominantemente lactobacilar) em amostras nas quais *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *U. urealyticum* e *U. parvum* são detectados por multiplex PCR isoladamente ou em múltiplas infecções.

Dentre as amostras com cervicite microscópica e microbiota normal (lactobacilar), aquelas com pelo menos um patógeno identificado por multiplex PCR são significativamente mais frequentes do que aquelas sem patógeno, a falha na identificação de um agente inflamatório em amostras de citologia cervical com intenso exsudato de neutrófilos pode sugerir a presença desses patógenos.

Uma observação sobre a intensidade da inflamação deve constar em laudos dos exames citológicos cervicais, para que esse achado citológico possa ser correlacionado com os resultados clínicos e os resultados de exames moleculares como os da PCR usada para a detecção de ISTs.

## 8. REFERÊNCIAS

- [1] Weinstein L, Bogin M, Howard J, Finkelstone B. A survey of the vaginal flora at various ages with special reference to the Doderlein bacillus. *Am J Obstet Gynecol.* 1936; 32:211-8.
- [2] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1(Suppl 1):4680-4687.
- [3] Mendling W. Vaginal Microbiota. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 902:83-93.
- [4] Kaambo E, Africa C, Chambuso R, Passmore JS. Vaginal Microbiomes Associated With Aerobic Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Front Public Health.* 2018; 6:78.
- [5] Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol.* 2017; 595 (2):451-463.
- [6] Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, Li L, Nelson KE, Xia Y, Xiang C. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics.* 2010; 11:488.
- [7] Wang C, Fan A, Li H, et al. Vaginal bacterial profiles of aerobic vaginitis: a case-control study. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020; 96(4):114981.
- [8] Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UM, Zhong X, Koenig SS, Fu L, Ma ZS, Zhou X, Abdo Z, Forney LJ, Ravel J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med.* 2012; 4(132):132ra52.
- [9] Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Nikita L, Galuppi M, Lamont RF, Chaemsaitong P, Miranda J, Chaiworapongsa T, Ravel J. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome.* 2014; 2(1):4.
- [10] Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Fadrosch D, Chang K, Silver MI, Viscidi RP, Burke AE, Ravel J, Gravitt PE. Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause.* 2018; 25(11):1321-1330.
- [11] Melkumyan AR, Pripitnevich TV, Ankirskaya AS, Murav'eva VV, Lubasovskaya LA. Effects of antibiotic treatment on the lactobacillus composition of vaginal microbiota. *Bull Exp Biol Med.* 2015; 158(6):766-8.
- [12] Greenbaum S, Greenbaum G, Moran-Gilad J, Weintraub AY. Ecological dynamics of the vaginal microbiome in relation to health and disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2019; 220(4):324-335.
- [13] Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertil Steril.* 2018; 110(3):327-336.
- [14] van de Wiggert JH, Borgdorff H, Verhelst R, et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?. *PLoS One.* 2014;9(8):e105998.
- [15] Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next? *Microbiome.* 2016; 4(1):58.
- [16] Amabebe E, Anumba DOC. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role



- of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)*. 2018; 5:181.
- [17] Borgdorff H, Armstrong SD, Tytgat HL, Xia D, Ndayisaba GF, Wastling JM, et al. Unique insights in the cervicovaginal *Lactobacillus iners* and *L.crispatus* Proteomes and their associations with microbiota dysbiosis. *PLoS ONE* (2016) 11:e0150767.
- [18] Tortelli BA, Lewis WG, Allsworth JE, Member-Meneh N, Foster LR, Reno HE, Peipert JF, Fay JC, Lewis AL. Associations between the vaginal microbiome and *Candida* colonization in women of reproductive age. *Am J Obstet Gynecol*. 2019; S0002-9378(19)31225-6
- [19] van Houdt R, Ma B, Bruisten SM, Speksnijder AGCL, Ravel J, de Vries HJC. *Lactobacillus iners*-dominated vaginal microbiota is associated with increased susceptibility to *Chlamydia trachomatis* infection in Dutch women: a case-control study. *Sex Transm Infect*. 2018; 94(2):117-123.
- [20] van de Wijgert JHHM, Jaspers V. The global health impact of vaginal dysbiosis. *Res Microbiol*. 2017;168(9-10):859-864.
- [21] Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016
- [22] Nomenclatura brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: recomendações para profissionais de saúde. - Rio de Janeiro: INCA, 2006. 65 p.
- [23] Nayar R, Wilbur DC. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, Criteria, and Explanatory Notes. Springer; 2015.
- [24] Bales CE. Benign disorders of the uterine cervix and vagina, volume 1. In: Koss LG, ed. *Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott; 2006. P.241-281.
- [25] Naylor B. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology, part 2. In: Bibbo M, Wilbur D. *Comprehensive Cytopathology*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company; 3rd ed. 2008. p. 77-90.
- [26] Cohen MS, Council OD, Chen JS. Sexually transmitted infections and HIV in the era of antiretroviral treatment and prevention: the biologic basis for epidemiologic synergy. *J Int AIDS Soc*. 2019; 22 Suppl 6:e25355.
- [27] Joseph Davey DL, Shull HI, Billings JD, Wang D, Adachi K, Klausner JD. Prevalence of Curable Sexually Transmitted Infections in Pregnant Women in Low- and Middle-Income Countries from 2010 to 2015: A Systematic Review. *Sex Transm Dis*. 2016; 43(7):450-8.
- [28] Rowley J, Vander Hoorn S, Korenromp E, Low N, Unemo M, Abu-Raddad LJ, Chico RM, Smolak A, Newman L, Gottlieb S, Thwin SS, Broutet N, Taylor MM. Chlamydia, gonorrhoea, trichomoniasis and syphilis: global prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*. 2019; 97(8):548-562P.
- [29] Unemo M, Seifert HS, Hook EW 3rd, Hawkes S, Ndowa F, Dillon JR. Gonorrhoea. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5(1):79.
- [30] McCormack D, Koons K. Sexually Transmitted Infections. *Emerg Med Clin North Am*. 2019; 37(4):725-738.
- [31] Witkin SS, Minis E, Athanasiou A, Leizer J, Linhares IM. *Chlamydia trachomatis*: the Persistent Pathogen. *Clin Vaccine Immunol*. 2017; 24(10):e00203-17.

- [32] Barnett R. Syphilis. *Lancet*. 2018; 391(10129):1471.
- [33] Holmes KK, Sparling PF, Stamm WE, Piot P, Wasserheit JN, Corey L, et al. Sexually transmitted diseases. 4th Ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2008.
- [34] Barrow RY, Ahmed F, Bolan GA, Workowski KA. Recommendations for Providing Quality Sexually Transmitted Diseases Clinical Services, 2020. *MMWR Recomm Rep*. 2020; 68(5):1-20.
- [35] Levy SB, Gunta J, Edemekong P. Screening for Sexually Transmitted Diseases. *Prim Care*. 2019; 46(1):157-173.
- [36] Rodrigues LLS, Hardick J, Nicol AF, Morgado MG, Martinelli KG, de Paula VS, Pilotto JH, Gaydos CA. Sexually transmitted infections among HIV-infected and HIV-uninfected women in the Tapajós region, Amazon, Brazil: Self-collected vs. clinician-collected samples. *PLoS One*. 2019;14(4): e0215001.
- [37] Azevedo MJN, Nunes SDS, Oliveira FG, Rocha DAP. High prevalence of *Chlamydia trachomatis* in pregnant women attended at Primary Health Care services in Amazon, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019;61: e6.
- [38] Dos Santos LM, Vieira MRMDS, Oliveira JFG, Trindade JQ, Brasiliense DM, Ferrari SF, Tsutsumi MY, Fuzii HT, Sousa Junior EC, Ishikawa EAY, Ishak R, de Sousa MS. High prevalence of sexual *Chlamydia trachomatis* infection in young women from Marajó Island, in the Brazilian Amazon. *PLoS One*. 2018;13(11): e0207853.
- [39] Ap Rocha D, Moraes CO, Araújo AF, Dos Santos Beltrão Ê, Castelo Dos Santos L, Menezes da Mata L, Nn Xavier A, Dos Santos Reis R, Cc Soares S, L Torres K, Levi JE, M Mariño J. *Chlamydia trachomatis* infection in women living in remote áreas in Amazonas, Brazil-a self-collection screening experience. *Int J STD AIDS*. 2019;30(4):336-343.
- [40] Lima LM, Hoelzle CR, Simões RT, Lima MIM, Fradico JRB, Mateo ECC, Zauli DAG, Melo VH. Sexually Transmitted Infections Detected by Multiplex Real Time PCR in Asymptomatic Women and Association with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2018;40(9):540-546.
- [41] Miranda AE, Silveira MF, Travassos AG, Tenório T, Val ICCD, Lannoy L, Junior HSM, Carvalho NS. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoea* and associated factors among women living with Human Immunodeficiency Virus in Brazil: a multicenter study. *Braz J Infect Dis*. 2017;21(4):402-407.
- [42] Costa-Lira E, Jacinto AHVL, Silva LM, Napoleão PFR, Barbosa-Filho RAA, Cruz GJS, Astolfi-Filho S, Borborema-Santos CM. Prevalence of human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, and *Trichomonas vaginalis* infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology. *Genet Mol Res*. 2017; 16(2).
- [43] Silveira MF, Scowitz IK, Entiauspe LG, Mesenburg MA, Stauffert D, Bicca GL, Pieniz C, Manta AB. *Chlamydia trachomatis* infection in young pregnant women in Southern Brazil: a cross-sectional study. *Cad Saude Publica*. 2017 13; 33(1):e00067415.
- [44] Robial R, Longatto-Filho A, Roteli-Martins CM, Silveira MF, Stauffert D, Ribeiro GG, Linhares IM, Tacla M, Zonta MA, Baracat EC. Frequency of *Chlamydia trachomatis* infection in cervical intraepithelial lesions and the status of cytological p16/Ki-67 dual-staining. *Infect Agent Cancer*. 2017; 12:3.
- [45] Travassos AG, Xavier-Souza E, Netto E, Dantas EV, Timbó M, Nóbrega I,

- Haguihara T, Neumeyer J, Lisboa N, Soidan MA, Ferreira F, Brites C. Anogenital infection by *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in HIV-infected men and women in Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(6):569-575.
- [46] Nonato DR, Alves RR, Ribeiro AA, Saddi VA, Segati KD, Almeida KP, de Lima YA, D'Alessandro WB, Rabelo-Santos SH. Prevalence and factors associated with coinfection of human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* in adolescents and young women. *Am J Obstet Gynecol.* 2016; 215(6): 753.e1-753.e9.
- [47] Pinto VM, Tancredi MV, Silva RJ, Khoury Z, Buchalla CM. Prevalence and factors associated with *Chlamydia trachomatis* infection among women with HIV in São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;49(3):312-8.
- [48] Brasiliense DM, Borges Bdo N, Ferreira WA. Genotyping and prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among women in Belém, Pará, northern Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2016;10(2):134-7.
- [49] Schmidt R, Muniz RR, Cola E, Stauffert D, Silveira MF, Miranda AE. Maternal *Chlamydia trachomatis* Infections and Preterm Births in a University Hospital in Vitoria, Brazil. *PLoS One.* 2015; 10(10):e0141367.
- [50] Cunha CB, Friedman RK, de Boni RB, Gaydos C, Guimarães MR, Siqueira BH, Cardoso SW, Chicayban L, Coutinho JR, Yanavich C, Veloso VG, Grinsztejn B. *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and syphilis among men who have sex with men in Brazil. *BMC Public Health.* 2015; 15:686.
- [51] Fernandes LB, Arruda JT, Approbato MS, García-Zapata MT. *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infection: factors associated with infertility in women treated at a human reproduction public service. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2014;36(8):353-8.
- [52] de Lima YA, Turchi MD, Fonseca ZC, Garcia FL, de Brito e Cardoso FA, da Guarda Reis MN, de Britto Guimarães EM, Alves RR, Carvalho NR, de Fátima Costa Alves M. Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil. *Int J Infect Dis.* 2014:16-21.
- [53] Tavares MC, de Macêdo JL, de Lima Júnior SF, de Andrade Heráclio S, Amorim MM, de Mascena Diniz Maia M, de Souza PR. *Chlamydia trachomatis* infection and human papillomavirus in women with cervical neoplasia in Pernambuco-Brazil. *Mol Biol Rep.* 2014; 41(2):865-74.
- [54] Jalkh AP, Miranda AE, Hurtado-Guerreiro JC, Ramos LA, Figliuolo G, Maia J, Costa CM, Ramasawmy R, de Lima Ferreira LC. *Chlamydia trachomatis* in human immunodeficiency virus-infected men treated at a referral hospital for sexually transmitted diseases in the Amazonas, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2014;18(2):158-63.
- [55] Borborema-Alfaia AP, Freitas NS, Astolfi Filho S, Borborema-Santos CM. *Chlamydia trachomatis* infection in a sample of northern Brazilian pregnant women: prevalence and prenatal importance. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(5):545-50.
- [56] Pantoja M, Campos EA, Pitta Dda R, Gabiatti JE, Bahamondes MV, Fernandes AM. [Prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection among women candidates for in vitro fertilization at a public institution of the State of São Paulo, Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012; 34(9):425-31.
- [57] Silva LC, Miranda AE, Batalha RS, Sabino CC, Dib E, Costa CM, Ramasawmy R, Talhari S. *Chlamydia trachomatis* infection among HIV-infected women attending an AIDS clinic in the city of Manaus, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2012; 16(4):335-8.

- [58] Christofolini DM, Leuzzi L, Mafra FA, Rodart I, Kayaki EA, Bianco B, Barbosa CP. Prevalence of cases of *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in women with no gynecologic complaints. *Reprod Med Biol*. 2012 Jul 11;11(4):201-205.
- [59] Machado MS, Costa e Silva BF, Gomes IL, Santana IU, Grassi MF. Prevalence of cervical *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active adolescents from Salvador, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2012; 16(2):188-91.
- [60] de Lima Freitas NS, Borborema-Santos CM, Barroso Serrão das Neves D, Costa de Oliveira CM, Dutra Ferreira JR, Astolfi-Filho S. High prevalence detection of *Chlamydia trachomatis* by polymerase chain reaction in endocervical samples of infertile women attending university hospital in Manaus-Amazonas, Brazil. *Gynecol Obstet Invest*. 2011;72(4):220-6.
- [61] Ramos BR, Poletini J, Marcolino LD, Vieira EP, Marques MA, Tristão AR, et al. Prevalence and risk factors of *Chlamydia trachomatis* cervicitis in pregnant women at the genital tract infection in obstetrics unit care at Botucatu Medical School, São Paulo State University-UNESP, Brazil. *J Low Genit Tract Dis* 2011; 15:20-4.
- [62] Garcês AX, de Martinez AMB, Gonçalves CV, Germano FN, Barral MFM, Vieira VC. Prevalência de *Chlamydia trachomatis* e fatores de risco associados à infecção detectada em amostra endocervical. *Revista Brasileira de Ginecologia E Obstetrícia* 2013; 35:379–83.
- [63] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.
- [64] David H. Martin, Book chapter *Genital mycoplasmas: Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, and Ureaplasma species* Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, updated edition, Eighth edition, 2015, 186, 2190-2193.
- [65] Bové JM. Molecular features of mollicutes. *Clin Infect Dis*. 1993; 17 Suppl 1:S10-31.
- [66] Waites KB, Bébéar CM, Robertson JA, Talkington DF & Kenny GE eds. *Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections*. Washington, D.C. American Society for Microbiology Press 2001.
- [67] Detecção de micoplasmas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em produtos intermediários da vacina contra a febre amarela produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz / Rafael Lawson Ferreira. – Rio de Janeiro, 2007.
- [68] Citti C, Browning GF & Rosengarten R. Phenotypic Diversity and Cell Invasion in Host Subversion by Pathogenic Mycoplasmas In: Blanchard A & Browning G eds. *Mycoplasmas Molecular Biology Pathogenicity and Strategies for Control*. Norfolk, Horizon Bioscience. 2005. Chap 13
- [69] Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn*. 2012; 14(5):437-50.

- [70] Jensen JS, Cusini M, Gomberg M, Moi H. Background review for the 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2016; 30(10):1686-1693.
- [71] Andersen B, Sokolowski I, Østergaard L et al. *Mycoplasma genitalium*: prevalence and behavioural risk factors in the general population. *Sex Transm Infect* 2007; 83: 237-241.
- [72] Oakeshott P, Aghaizu A, Hay P et al. Is *Mycoplasma genitalium* in women the “New Chlamydia?” A community-based prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2010; 51: 1160-1166.
- [73] Manhart LE, Holmes KK, Hughes JP, Houston LS, Totten PA. *Mycoplasma genitalium* among young adults in the United States: an emerging sexually transmitted infection. *Am J Public Health* 2007; 97: 1118-1125.
- [74] Sonnenberg P, Ison CA, Clifton S et al. Epidemiology of *Mycoplasma genitalium* in British men and women aged 16-44 years: evidence from the third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). *Int J Epidemiol* 2015; 44: 1982-1994.
- [75] Taylor-Robinson D, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to Multicolored Butterfly. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24: 498-514.
- [76] Cohen CR, Manhart LE, Bukusi EA et al. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. *Lancet* 2002; 359: 765-766.
- [77] Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK et al. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis* 2003; 187: 650-657.
- [78] Cohen CR, Mugo NR, Astete SG et al. Detection of *Mycoplasma genitalium* in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. *Sex Transm Infect* 2005; 81: 463-466.
- [79] Anagnrius C, Lore B, Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. *Sex Transm Infect* 2005; 81: 458-462.
- [80] Falk L, Fredlund H, Jensen JS. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. *Sex Transm Infect* 2005; 81: 73-78.
- [81] Lis R, Rowhani-Rahbar A, Manhart LE. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2015; 61: 418-426.
- [82] Wiesenfeld HC, Manhart LE. *Mycoplasma genitalium* in Women: Current Knowledge and Research Priorities for This Recently Emerged Pathogen. *J Infect Dis*. 2017; 216(suppl\_2):S389-S395.
- [83] Horner P, Donders G, Cusini M, Gomberg M, Jensen JS, Unemo M. Should we be testing for urogenital *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* in men and women? - a position statement from the European STI Guidelines Editorial Board. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2018; 32(11):1845-1851.
- [84] Taylor-Robinson D. Mollicutes in vaginal microbiology: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma genitalium*. *Res Microbiol* 2017; 168: 875-881.
- [85] Huang C, Zhu HL, Xu KR, Wang SY, Fan LQ, Zhu WB. *Mycoplasma* and *ureaplasma* infection and male infertility: a systematic review and meta-analysis.

- Andrology.2015; 3(5):809-16.
- [86] Zhang N, Wang R, Li X, Liu X, Tang Z, Liu Y. Are *Ureaplasma* spp. a cause of nongonococcal urethritis? A systematic review and meta-analysis. PLoS One. 2014; 9(12):e113771.
- [87] Leli C, Mencacci A, Latino MA et al. Prevalence of cervical colonization by *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in childbearing age women by a commercially available multiplex real-time PCR: An Italian observational multicentre study. J Microbiol Immunol Infect 2018; 51: 220-225.
- [88] Esen B, Gozalan A, Sevindi DF et al. *Ureaplasma urealyticum*: presence among sexually transmitted diseases. Jpn J Infect Dis 2017; 70: 75-79
- [89] Marovt M, Kese D, Kotar T et al. *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* detected with the same frequency among women with and without symptoms of urogenital tract infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015; 34: 1237-1245.
- [90] Lobao TN, Campos GB, Selis NN et al. *Ureaplasma urealyticum* and *U. parvum* in sexually active women attending public health clinics in Brazil. Epidemiol Infect 2017; 145: 2341-2351.
- [91] Ahmadi MH, Mirsalehian A, Bahador A. Prevalence of urogenital Mycoplasmas in Iran and their effects on fertility potential: A systematic review and meta-analysis. Iran J Public Health 2016; 45: 409-422
- [92] Kyndel A, Elmer C, Kallman O, Altman D. Mycoplasmatataceae colonizations in women with urethral pain syndrome: A case-control study. J Low Genit Tract Dis 2016; 20: 272-274.
- [93] Daxboeck F, Iro E, Tamussino K, Krause R, Assadian O, Wenisch C. Bacteremia with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients undergoing hysterectomy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2003; 22: 608-611
- [94] Ruan Z, Yang T, Shi X, Kong Y, Xie X, Zhang J. Clonality and distribution of clinical *Ureaplasma* isolates recovered from male patients and infertile couples in China. PLoS One 2017; 12: e0183947
- [95] Ouzounova-Raykova VV, Markovska R, Mizgova G, Mitov IG. Detection of the sexually transmissible genital mycoplasmas by polymerase chain reaction in women. Sex Health 2011; 8: 445-446
- [96] Murtha AP, Edwards JM. The role of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* in adverse pregnancy outcomes. Obstet Gynecol Clin North Am. 2014;41(4):615-627
- [97] Donders GGG, Ruban K, Bellen G, Petricevic L. *Mycoplasma/Ureaplasma* infection in pregnancy: to screen or not to screen. J Perinat Med. 2017; 45(5):505–515.
- [98] Järvinen A-K, Laakso S, Piiparinen P, Aittakorpi A, Lindfors M, Huopaniemi L, et al. Rapid identification of bacterial pathogens using a PCR- and microarray-based assay. BMC Microbiol 2009; 9:161.
- [99] de Salazar A, Espadafor B, Fuentes-López A, et al. Comparison between Aptima Assays (Hologic) and the Allplex STI Essential Assay (Seegene) for the diagnosis of Sexually transmitted infections. PLoS One. 2019; 14(9):e0222439.
- [100] Lanjouw E, Ouburg S, de Vries HJ, Stary A, Radcliffe K, Unemo M. 2015 European guideline on the management of *Chlamydia trachomatis* infections. Int J STD AIDS. 2016; 27(5):333–348.

- [101] Hilbert SM, Reno HEL. Management of Patients with Sexually Transmitted Infections in the Emergency Department. *Emerg Med Clin North Am.* 2018;36(4):767-776.
- [102] Robinet S, Parisot F. Accreditation of a multiplex real time PCR assay for detection and semi-quantitative determination of pathogens responsible of sexually-transmitted infections. *Ann Biol Clin (Paris).* 2018;76(4):459-005A476.
- [103] Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1528-33.
- [104] Hawkins SF, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol Biol.* 2017; 1546:125–133.
- [105] Kriesel JD, Bhatia AS, Barrus C, Vaughn M, Gardner J, Crisp RJ. Multiplex PCR testing for nine different sexually transmitted infections. *Int J STD AIDS.* 2016; 27(14):1275-1282.
- [106] Kim Y, Kim J, Lee KA. Analytical Performance of Multiplex Real-Time PCR for Six Sexually Transmitted Pathogens. *Clin Lab.* 2015; 61(11):1749-1754.
- [107] Acquah R, Winter AJ, Jackson C, Gunson RN. A combined multiplex PCR test for herpes simplex-1/2 and *Treponema pallidum*: a review of 5-year routine use. *Sex Transm Infect.* 2017; 93(5):326.
- [108] McIver CJ, Rismanto N, Smith C, et al. Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical mycoplasma, ureaplasma, and trichomonas and viral agent infections in sexually active australian women. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(5):1358-1363.
- [109] Abou Tayoun AN, Burchard PR, Caliendo AM, Scherer A, Tsongalis GJ. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Trichomonas vaginalis*. *Exp Mol Pathol.* 2015; 98(2):214-218.
- [110] van der Veer C, van Houdt R, van Dam A, de Vries H, Bruisten S. Accuracy of a commercial multiplex PCR for the diagnosis of bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 2018; 67(9):1265-1270.
- [111] Pramanick R, Mayadeo N, Warke H, Begum S, Aich P, Aranha C. Vaginal microbiota of asymptomatic bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis: Are they different from normal microbiota? *Microb Pathog.* 2019; 134:103599.
- [112] Arastehfar A, Fang W, Pan W, Liao W, Yan L, Boekhout T. Identification of nine cryptic species of *Candida albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis* complexes using one-step multiplex PCR. *BMC Infect Dis.* 2018; 18(1):480.
- [113] Mahmoudi Rad M, Zafarghandi ASh, Amel Zabihi M, Tavallae M, Mirdamadi Y. Identification of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis by multiplex PCR. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012; 2012:872169.
- [114] Tjagur S, Mändar R, Punab M. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and other sexually transmitted infections causing urethritis among high-risk heterosexual male patients in Estonia. *Infect Dis (Lond).* 2018; 50(2):133-139.
- [115] Mudau M, Peters RP, De Vos L, et al. High prevalence of asymptomatic sexually transmitted infections among human immunodeficiency virus-infected pregnant women in a low-income South African community. *Int J STD AIDS.* 2018;

- 29(4):324-333.
- [116] Brosh-Nissimov T, Kedem R, Ophir N, Shental O, Keller N, Amit S. Management of sexually transmissible infections in the era of multiplexed molecular diagnostics: a primary care survey. *Sex Health* 2018; 15:298-303.
- [117] Canberk S, Longatto-Filho A, Schmitt F. Molecular diagnosis of infectious diseases using cytological specimens. *Diagn Cytopathol* 2016; 44:156-64.
- [118] Brosh-Nissimov T, Kedem R, Ophir N, Shental O, Keller N, Amit S. Management of sexually transmissible infections in the era of multiplexed molecular diagnostics: a primary care survey. *Sex Health* 2018; 15:298-303.
- [119] Lima L de M, Hoelzle CR, Simões RT, Lima MI de M, Fradico JRB, Mateo ECC, et al. Sexually Transmitted Infections Detected by Multiplex Real Time PCR in Asymptomatic Women and Association with Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2018; 40:540-6.
- [120] Workowski KA. Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis.* 2015;61 Suppl 8: S759-S762.
- [121] Zanotta N, Campisciano G, Morassut S, Castro-Silva E, Luksa V, Zito G, et al. Emerging role for *Ureaplasma parvum* serovar 3: Active infection in women with silent high-risk human papillomavirus and in women with idiopathic infertility. *J Cell Physiol* 2019; 234:17905-11.
- [122] Hunjak B, Sabol I, Vojnović G, Fistončić I, Erceg AB, Peršić Z, et al. *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in women of reproductive age. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2014; 289:407-12.
- [123] Hoda RS, Loukeris K, Abdul-Karim FW. Gynecologic cytology on conventional and liquid-based preparations: a comprehensive review of similarities and differences. *Diagn Cytopathol.* 2013; 41(3):257-278.
- [124] Guo M, Hu L, Martin L, Liu S, Baliga M, Hughson MD. Accuracy of liquid-based Pap tests: comparison of concurrent liquid-based tests and cervical biopsies on 782 women with previously abnormal Pap smears. *Acta Cytol* 2005; 49:132-8.
- [125] Karnon J, Peters J, Platt J, Chilcott J, McGoogan E, Brewer N. Liquid-based cytology in cervical screening: an updated rapid and systematic review and economic analysis. *Health Technol Assess* 2004; 8: iii, 1–78.
- [126] Dehon PM, McGowin CL. *Mycoplasma genitalium* infection is associated with microscopic signs of cervical inflammation in liquid cytology specimens. *J Clin Microbiol* 2014; 52:2398-405.
- [127] Lusk MJ, Josephine Lusk M, Garden FL, Rawlinson WD, Naing ZW, Cumming RG, et al. Cervicitis aetiology and case definition: a study in Australian women attending sexually transmitted infection clinics. *Sexually Transmitted Infections* 2016; 92:175-81.
- [128] Carneiro FP, Ferreira VM, Silvestre FA, da Costa FJQ, von Glehn M de P, de Vasconcelos Carneiro M, et al. Aerobic bacteria on cervical cytology. *Diagnostic Cytopathology* 2018; 46:547-9.
- [129] Donders GGG, Bellen G, Grinceviciene S, Ruban K, Vieira-Baptista P. Aerobic vaginitis: no longer a stranger. *Research in Microbiology* 2017; 168: 845-58. .
- [130] Nathan B, Appiah J, Saunders P, Heron D, Nichols T, Brum R, et al. Microscopy outperformed in a comparison of five methods for detecting *Trichomonas vaginalis*



- in symptomatic women. *International Journal of STD & AIDS* 2015; 26:251-6.
- [131] Kim S-J, Lee DS, Lee S-J. The prevalence and clinical significance of urethritis and cervicitis in asymptomatic people by use of multiplex polymerase chain reaction. *Korean J Urol* 2011; 52:703-8.
- [132] Cossé MM, Hayward RD, Subtil A. One Face of *Chlamydia trachomatis*: The Infectious Elementary Body. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018; 412:35-58.
- [133] Wan FYM, Enciso GA. Optimal Proliferation and Differentiation of *Chlamydia trachomatis*. *Stud Appl Math*. 2017; 139(1):129-178.
- [134] Zhao W, Wang H, Wang Y, Li J, Wu X. *Trichomonas vaginalis* infection-associated risk of cervical cancer: A meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2018; 228:166-173.
- [135] Naldini G, Grisci C, Chiavarini M, Fabiani R. Association between human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis* infection risk in women: a systematic review and meta-analysis. *Int J Public Health*. 2019; 64(6):943-955.
- [136] Liu L, Cao G, Zhao Z, Zhao F, Huang Y. High bacterial loads of *Ureaplasma* may be associated with non-specific cervicitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2014; 46:637-41.
- [137] Shimada Y, Ito S, Mizutani K, Sugawara T, Seike K, Tsuchiya T, et al. Bacterial loads of *Ureaplasma urealyticum* contribute to development of urethritis in men. *International Journal of STD & AIDS* 2014; 25:294-8.

## APÊNDICE A

**Tabela 3.** Amostras cervicais sem patógenos identificados por multiplex PCR e respectivos achados citológicos (microbiota e presença de cervicite microscópica).

<i>n</i>	Microbiota	Cervicite microscópica	Atipias citológicas
1	Lactobacilos, cocobacilos	x	
2	Bacilos supracitoplamáticos		
3	Bacilos supracitoplasmáticos		
4	Lactobacilos, cocobacilos		ASC-US
5	Lactobacilos		
6	Lactocabilos		
7	Lactobacilos	x	
8	Lacitobacilos, cocobacilos		
9	Lactobacilos		
10	Lactobacilos		
11	Lactobacilos		
12	Lactobacilos, cocobacilos	x	
13	Lactobacilos		
14	Bacilos supracitoplamáticos		
15	Lactobacilos, cococacilos		
16	Lactobacilos	x	
17	Bacilos supracitoplamáticos		
18	Lactobacilos, cocobacilos		
19	Bacilos supracitoplamáticos	x	
20	Lactobacilos, cocobacilos	x	
21	Lactobacilos, cocobacilos	x	
22	Bacilos supracitoplamáticos	x	
23	cocobacilos	x	(I)
24	Lactobacilos, cocobacilos	x	
25	Bacilos supracitoplamáticos		
26	Lactobacilos, cocobacilos		
27	Bacilos supracitoplamáticos	x	
28	Lactobacilos, cocobacilos	x	
29	Lactobacilos, cocobacilos	x	AGC
30	Lactobacilos, cocobacilos	x	

I= insatisfatória por piócitos; ASC-US= Células escamosas atípicas de significado indeterminado; AGC =Células glandulares atípicas.

**ANEXO A**

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FEPECS/SES-DF



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** RASTREAMENTO DA INFECÇÃO GENITAL POR CHLAMYDIA TRACHOMATIS: CRIAÇÃO DE FLUXOGRAMAS PARA DETECÇÃO DA DOENÇA EM PACIENTES SINTOMÁTICAS E ASSINTOMÁTICAS VISANDO A IMPLANTAÇÃO NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE

**Pesquisador:** FABIANA PIRANI CARNEIRO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 37194114.4.0000.5553

**Instituição Proponente:** Hospital Materno Infantil de Brasília - HMIB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 942.649

**Data da Relatoria:** 01/02/2015

#### Apresentação do Projeto:

Inalterado em relação ao Parecer Consubstanciado de 10/11/2014 do CEP/FEPECS/SES/DF.

#### Objetivo da Pesquisa:

Inalterado em relação ao Parecer Consubstanciado de 10/11/2014 do CEP/FEPECS/SES/DF.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterado em relação ao Parecer Consubstanciado de 10/11/2014 do CEP/FEPECS/SES/DF.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Inalterado em relação ao Parecer Consubstanciado de 10/11/2014 do CEP/FEPECS/SES/DF.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Inalterado em relação ao Parecer Consubstanciado de 10/11/2014 do CEP/FEPECS/SES/DF.

#### Recomendações:

Fazem parte do projeto de pesquisa: folha de rosto devidamente preenchida, termo de concordância do diretor do HMIB, Curriculum vitae do pesquisador responsável e demais pesquisadores, planilha de orçamento, referências bibliográficas, cronograma e TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: O TCLE deverá ser elaborado com

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-904

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3325-4955

**Fax:** (33)3325-4955

**E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FEPECS/SES-DF



Continuação do Parecer: 942.649

linguagem simples e acessível ao sujeito da pesquisa, de tal modo que o paciente deve ser suficientemente esclarecido e não apenas “informado” quanto a todos os detalhes do projeto de pesquisa. Dirigir-se ao sujeito da pesquisa em forma de convite e não de uma declaração. \*Deverá ficar claro a aplicação de questionários e o tempo de duração da aplicação dos mesmos. \*No TCLE deve assegurar ao indivíduo o direito de recusar-se a responder perguntas que ocasionem constrangimentos de alguma natureza e que em caso de recusa em participar da pesquisa não haverá penalização ou prejuízo de atendimento naquele serviço.

\*Corrigir tópico sobre riscos na metodologia e no TCLE, pois segundo a CNS 466/2012 artigo V.2 toda pesquisa com seres humanos envolve riscos em tipos e gradações variados sejam eles considerados nas dimensões física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual desses. Solicitamos descrever os desconfortos provocados pelo exame colpocitológico aos sujeitos da pesquisa.

\*Solicitamos esclarecimentos dos profissionais que farão a coleta dos exames colpocitológicos, serão os pesquisadores? Em caso de profissionais diferentes, esses serão considerados co-participantes e se faz necessário anexar Curriculum vitae dos mesmos na PB.

Solicitamos Termo de Concordância do responsável pelas unidades móveis onde será desenvolvida a pesquisa na SES-DF.

\*Solicitamos descrever a fonte de recursos da pesquisa em planilha de orçamento detalhada.

Solicitamos anexar os questionários que serão aplicados na pesquisa, afim que justifiquem os objetivos específicos da pesquisa.

### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Pendências acima citada atendidas.

### **Situação do Parecer:**

Aprovado

### **Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

### **Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-904

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3325-4955

**Fax:** (33)3325-4955

**E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Secretaria de Estado de Saúde  
do Distrito Federal

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FEPECS/SES-DF



Continuação do Parecer: 942.649

BRASILIA, 02 de Fevereiro de 2015

---

**Assinado por:  
Helio Bergo  
(Coordenador)**

**Endereço:** SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

**Bairro:** ASA NORTE

**CEP:** 70.710-904

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3325-4955

**Fax:** (33)3325-4955

**E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com

**ANEXO B**

Instruções de Uso

Kit MULTIPLEX Plus para Detecção de Patógenos Causadores de Uretrite



## Instruções de Uso

### XGEN MULTI UP

#### Kit MULTIPLEX Plus para Detecção de Patógenos Causadores de Uretrite

##### 1. USO PRETENDIDO

O Kit **XGEN MULTI UP** é um teste *in vitro* para a detecção qualitativa de ácido nucleico bacteriano em amostras de *swabs*, cultura e urina como um auxílio na avaliação de infecções por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*.

O kit foi otimizado para uso no aparelho de PCR em Tempo Real ABI 7500 (Software Sequence Detection System® Applied Biosystems™).

##### PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO DE USO *IN VITRO*.

##### 2. INTRODUÇÃO

**Chlamydia trachomatis** (CT), é uma bactéria gram-negativa intracelular obrigatória e é a causa de uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns causando morbidades reprodutivas sérias. A maioria das pessoas com infecção por CT não sabem que estão infectadas, pois não existem sintomas clínicos. Caso não seja tratada, pode causar graves complicações. Nos homens, a CT é associada com a uretrite não gonocócica e epididimite. Em mulheres, a infecção por CT pode levar a complicações graves, incluindo doença inflamatória pélvica e sequelas subsequentes, como gravidez ectópica, infertilidade e dor pélvica crônica. Infecção por CT em recém-nascidos pode causar oftalmia neonatal.

**Neisseria gonorrhoeae** (NG) é um diplococo gram-negativo com genoma circular de DNA. Um atributo importante da virulência de *N. gonorrhoeae* é a sua variabilidade fenotípica. É a segunda infecção bacteriana mais prevalente transmitida sexualmente no mundo. A doença é associada com alta morbidade,

consequências socioeconômicas e continua sendo um problema de saúde pública. A NG pode causar graves complicações, como epididimite em homens e doença inflamatória pélvica em mulheres levando a infertilidade involuntária e gravidez ectópica. As localizações de infecção extragenital incluem o reto, orofaringe e olhos.

**Mycoplasma genitalium** (MG) é um microrganismo do trato genital. Está associado a importantes síndromes inflamatórias do trato reprodutivo. Em homens, *M. genitalium* é conhecido como um importante causador de uretrite não gonocócica. Em mulheres, pode causar cervicite, endometrite, uretrite e doença inflamatória pélvica. Outras evidências sugerem que MG infecta regiões extragenitais como as membranas mucosas dos tratos respiratório e digestivo.

**Trichomonas vaginalis** (Tvag) é um protozoário anaeróbico flagelado causador da tricomoníase, uma infecção transmitida sexualmente no trato urogenital. A tricomoníase é a causa mais comum de vaginite em mulheres, e geralmente é observado um corrimento vaginal anormal. Mulheres grávidas com tricomoníase podem ter bebês com peso baixo ao nascer e/ou parto prematuro. Homens com esta infecção podem apresentar sintomas de uretrite. Sem tratamento, a tricomoníase pode aumentar o risco de a pessoa adquirir HIV. A OMS estima que 160 milhões de casos de infecção sejam adquiridas anualmente em todo o mundo.

**Mycoplasma hominis** (Mhom) é uma bactéria oportunista sem parede celular que frequentemente coloniza o trato genital de homens e mulheres sexualmente ativos. Podem ser comensais ou patogênicas, sendo agente causador de doença inflamatória pélvica e infecções durante a gravidez, e também tem sido associada com a vaginose bacteriana, febre pós-aborto e pós-parto. Em recém-nascidos pode causar pneumonia, meningite ou abscessos. Também está envolvido em infecções extragenitais, especialmente em pacientes imunocomprometidos.

**Ureaplasma urealyticum/parvum** (Uurea/Uparv) são bactérias gram-negativas pertencentes à família *Mycoplasmataceae* desprovidas de parede



celular. Os patógenos do gênero *Ureaplasma* fazem parte da flora genital normal de homens e mulheres. Em 2002, foi proposto subdividir este gênero em *U. parvum*, compreendendo os sorotipos 1, 3, 6 e 14 e *U. urea*, compreendendo os sorotipos 2, 4, 5 e 7 a 13. Estes subtipos não podem ser distinguidos um dos outros com métodos de rotina de microbiologia e são, portanto, geralmente referidas como gênero *Ureaplasma*. Podem ser encontradas no trato genital baixo em quase 50% das mulheres grávidas como parte da flora vaginal normal. A Uurea e Uparv foram descritas por serem associadas a um número de doenças, incluindo uretrite não específica, infertilidade, corioamnionite, nascimento de crianças mortas, nascimento prematuro, e, no período perinatal, pneumonia, displasia bronco-pulmonar e meningite.

### 3. PRINCÍPIO DO TESTE

O DNA bacteriano/protozoário de diferentes patógenos é amplificado no mesmo tubo pela reação em cadeia da polimerase. A presença de uma sequência específica do patógeno na reação é detectada por um aumento na fluorescência observada a partir da sonda correspondente duplamente marcada, e é relatado como o valor limiar de ciclo (Ct) pelo termociclador em Tempo Real. O ensaio utiliza o Citomegalovírus de Murino (mCMV) como controle de extração - Controle Interno (CI), adicionado a cada amostra e ao Controle Negativo no processo de extração.

<b>Especificidade Tvag</b>	100% para <i>Trichomonas vaginalis</i>
<b>Especificidade Mhom</b>	100% para <i>Mycoplasma hominis</i>
<b>Especificidade Uurea</b>	100% para <i>Ureaplasma urealyticum</i>
<b>Especificidade Uparv</b>	100% para <i>Ureaplasma parvum</i>

<b>Sensibilidade (LOD) CT</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) NG</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) MG</b>	10 <sup>4</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) Tvag</b>	10 <sup>2</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) Mhom</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) Uurea</b>	10 <sup>3</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%
<b>Sensibilidade (LOD) Uparv</b>	10 <sup>2</sup> cópias/mL com probabilidade ≥ 95%

### 4. COMPONENTES

O formato padrão do kit contém reagentes para 64 testes.

COMPONENTES	CONTEÚDO	QUANTIDADE
<b>EZ UP</b>	Solução de Enzima e dNTPs	2 x 64 µL
<b>TAMPÃO UP</b>	Mistura de Tampão	2 x 800 µL

<b>Especificidade CT</b>	100% para <i>Chlamydia trachomatis</i>
<b>Especificidade NG</b>	100% para <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<b>Especificidade MG</b>	100% para <i>Mycoplasma genitalium</i>

<b>PS UP 1</b>	Mistura de <i>Primers</i> e Sondas para CT, NG, MG, mCMV (Ci)	2 x 48 µL
<b>PS UP 2</b>	Mistura de <i>Primers</i> e Sondas para Tvag, Mhom, Uurea, Uparv	2 x 48 µL
<b>CP UP 1</b>	Controle Positivo Contendo Plasmídeos para Detecção de CT, NG, MG	2 x 150 µL
<b>CP UP 2</b>	Controle Positivo Contendo Plasmídeos para detecção de Tvag, Mhom, Uurea, Uparv	2 x 150 µL
<b>CI UP</b>	Controle Interno	2 x 128 µL
<b>CN 6</b>	Controle Negativo	4 x 1.000 µL

\*Cada frasco contém um volume adicional para imprecisão de pipetagem.

## 5. ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

Os componentes do kit devem ser armazenados na embalagem original à temperatura de -25°C a -15°C e são estáveis até à data de vencimento indicada no rótulo. O produto é fornecido em embalagens com gelo seco que devem garantir uma temperatura de transporte entre -25°C e -15°C (satisfatória de acordo com os estudos de estabilidade). Congelar o produto imediatamente após o uso. Deve ser o evitado o congelamento e o descongelamento dos reagentes por mais de nove vezes, pois pode reduzir a sensibilidade do ensaio.

Recomenda-se realizar alíquotas dos reagentes de acordo com suas necessidades após o primeiro descongelamento.

## 6. MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- ✓ Micropipetas calibradas (0,5 µL < volume < 200 µL);
- ✓ Centrífuga de bancada;

- ✓ Racks para tubos;
- ✓ Ponteiras estéreis com filtro;
- ✓ Microtubos livres de nuclease;
- ✓ Microplacas de PCR, recomendados pelo fabricante do equipamento de PCR em Tempo Real;
- ✓ Filme selador;
- ✓ Luvas descartáveis sem talco;
- ✓ Termociclador para PCR em Tempo Real;
- ✓ Agitador tipo *vortex* ou similar;
- ✓ Cabine de fluxo laminar.

## 7. AVISOS E PRECAUÇÕES

1. O kit deve ser utilizado somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
2. O pessoal técnico deve ser profundamente treinado no uso dos termocicladores em Tempo Real, na manipulação de reagentes de biologia molecular e qualificados em protocolos de amplificação de PCR em Tempo Real.
3. Todo o pessoal envolvido na execução do teste deve utilizar equipamentos de proteção individual. O uso de objetos perfuro-cortantes deve ser evitado. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
4. Os responsáveis pelo manuseio de amostras devem ser vacinados contra tétano, difteria, hepatite B e os estabelecidos no PCMSO, de acordo com a Norma Regulamentadora 32.
5. O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes como poeira ou agentes microbianos transportados pelo ar.



6. Evitar vibração na superfície da bancada onde o teste é realizado.
7. Após o recebimento, armazenar o kit entre -25°C e -15°C, em um freezer ou câmara fria com temperatura controlada.
8. Não trocar os componentes entre diferentes lotes dos kits. Recomenda-se que os componentes entre dois kits do mesmo lote também não sejam trocados.
9. Verificar se os reagentes estão limpos e não contém partículas visíveis pesadas ou grumos. Caso contrário, comunicar o supervisor do laboratório para iniciar os procedimentos necessários para reposição do kit.
10. Evitar contaminação cruzada das amostras utilizando ponteiros descartáveis e trocando-as após cada amostra.
11. Evitar contaminação cruzada entre os reagentes do kit utilizando ponteiros descartáveis e trocando-as entre o uso de cada uma.
12. Não utilizar o kit após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
13. Tratar todas as amostras como potencialmente infectantes. Todas as amostras devem ser manuseadas em Nível de Biossegurança 2, como recomendado pela legislação em vigor.
14. Armazenar e extrair as amostras separadamente de outros reagentes e utilizar sala dedicada para o manuseio.
15. Realizar os procedimentos o mais rápido possível, mantendo os componentes no gelo ou em reservatório refrigerado.
16. O fluxo de trabalho no laboratório deve proceder de maneira unidirecional, começando na área de extração e passando para a amplificação e área de análises de dados. Não retornar as amostras, equipamentos e reagentes para a área onde as primeiras etapas foram realizadas.
17. O uso de plásticos descartáveis é recomendado na preparação dos componentes líquidos ou na transferência dos componentes para sistemas automatizados, a fim de evitar contaminação cruzada.

18. Os resíduos gerados durante a utilização do kit devem ser descartados, de acordo com as diretrizes e regras de descarte de resíduos químicos e substâncias biológicas do laboratório, conforme legislação em vigor.

19. Os respingos provocados acidentalmente durante o manuseio das amostras devem ser absorvidos por lenços de papel umedecidos com hipoclorito, e em seguida, com água.

20. Outros resíduos gerados (exemplo: ponteiros usadas para amostras) devem ser manuseados como potencialmente infectantes e descartados, de acordo com as diretrizes e regras relativas a resíduos laboratoriais.

## 8. AMOSTRAS: PREPARAÇÃO E RECOMENDAÇÕES

O ensaio deve ser realizado com ácido nucleico extraído de amostras de swab genital e retal e urina (primeiro jato) de origem humana.

Para longos períodos de armazenamento recomenda-se que todas as amostras fiquem a -20°C até a extração.

**OBSERVAÇÃO IMPORTANTE:** Para utilização do kit com outras amostras deverá ser realizada a validação para confirmar que os requisitos necessários para a finalidade pretendida são atendidos.

## 9. PREPARAÇÃO DOS COMPONENTES E AVISOS

### Solução de Enzima e dNTPs - EZ UP

Solução pronta para uso. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

### Solução Tampão - TAMPÃO UP

Solução pronta para uso. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.



### Primers e Sondas - PS UP (1 e 2)

Solução pronta para uso. Antes de utilizar, descongelar, homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso) para concentrar o componente no fundo do tubo.

### Controle Positivo - CP (1 e 2)

Solução pronta para uso. Não extrair o Controle Positivo, uma vez que a solução é constituída por plasmídeos e a reação será inibida.

### Controle Negativo - CN

Descongelar o Controle Negativo. Antes de utilizar, homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).

### Controle Interno - CI

Descongelar o Controle Interno. Antes de utilizar, homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).

Na extração, para volume de eluição de 55 µL, recomenda-se adicionar 2 µL do Controle Interno ao tampão de lise em cada extração. Nunca adicionar o Controle Interno diretamente à amostra, ao menos que esteja diluída no tampão de lise. Caso seja utilizado volume de eluição diferente do descrito acima, adicionar o volume de Controle Interno proporcional. *vortex*

ELUIÇÃO	CI
50 µL a 65 µL	2 µL
66 µL a 90 µL	3 µL
Acima de 90 µL	4 µL

**IMPORTANTE:** Adicionar o Controle Interno a cada uma das amostras e ao Controle Negativo é uma etapa muito importante para confirmar o sucesso do procedimento de extração de ácido nucleico e para verificar possível inibição da PCR.

## 10. EQUIPAMENTOS E FERRAMENTAS USADOS EM COMBINAÇÃO COM O KIT

### 1. Micropipetas

As micropipetas devem estar calibradas para dispensar o volume correto necessário para o teste e devem ser submetidas a descontaminações regulares das partes que podem acidentalmente entrar em contato com a amostra. Elas devem ser certificadas e devem estar com seus certificados válidos a fim de mostrar precisão de 1% e uma exatidão de  $\pm 5\%$ .

### 2. Termociclador em Tempo Real

O Kit **XGEN MULTI UP** é direcionado para uso em combinação somente com o Termociclador ABI 7500 (Software Sequence Detection System<sup>®</sup>, Applied Biosystems<sup>™</sup>). Os usuários finais devem seguir estritamente a instrução de uso fornecida pelo fabricante.

Para utilização do kit em outros equipamentos deverá ser realizada a validação para confirmar que os requisitos necessários para a finalidade pretendida são atendidos.

## 11. CONTROLE PRÉ-ENSAIO E OPERAÇÕES

1. Verificar a data de validade do kit impresso na etiqueta externa da caixa.
2. Verificar se os componentes líquidos não estão contaminados por partículas visíveis a olho nu ou grumos. Observar se há ruptura na caixa de transporte e se não há derramamento de líquido dentro da caixa.
3. Ligar os termocicladores e verificar as configurações para garantir a utilização do protocolo de ensaio correto.
4. Seguir estritamente o manual de equipamentos fornecidos pelo fabricante para a correta configuração dos termocicladores em Tempo Real.
5. Verificar se as micropipetas estão configuradas para o volume necessário.
6. Verificar se todos os outros equipamentos estão prontos para o uso.
7. Em caso de problemas, não continuar o teste e comunicar ao supervisor.

## 12. PROTOCOLO

**IMPORTANTE:** Um exemplo de gabarito para dispensação dos reagentes é informado no item Gabarito do Teste. Favor consultar o item antes de iniciar o procedimento prático.

**ATENÇÃO:** Utilizar somente microplacas recomendadas pelo fabricante do termociclador em Tempo Real.

### CONTROLES DE AMPLIFICAÇÃO

É obrigatório validar cada sessão de amplificação com reações de Controle Negativo e Controle Positivo.

### PREPARAÇÃO DA MISTURA DE AMPLIFICAÇÃO

Para cada frasco de Primer e Sonda (PS), preparar uma mistura com os seguintes componentes: tampão, primer e sonda e enzima.

# Reações Componente	x 1	x 16	x 32	x 64
TAMPÃO UP	12,5 µL	200 µL	400 µL	800 µL
PS UP (1 e 2)	1,5 µL	24 µL	48 µL	96 µL
EZ UP	1 µL	16 µL	32 µL	64 µL
<b>Volume Total</b>	<b>15 µL</b>	<b>240 µL</b>	<b>480 µL</b>	<b>960 µL</b>

**Tabela 1. Quantidade de Reagente Necessária para Número de Reações Especificado.**

- Separar um microtubo de 1,5 mL (não fornecido) para preparar cada mistura de amplificação.
- Descongelar os reagentes para a reação: PS UP (1 e 2), Controle Positivo (CP) e TAMPÃO UP. Homogeneizar em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso). O CP deve ser descongelado em temperatura ambiente por 20-30 minutos e homogeneizado

completamente antes do uso. Certificar-se de manter a EZ UP no freezer ou em bloco de refrigeração o tempo todo.

- Pipetar a quantidade requerida de TAMPÃO UP dentro de cada microtubo. Trocar as ponteiros após cada passo de pipetagem.
- Pipetar a quantidade requerida de PS UP e EZ UP dentro do microtubo.
- Homogeneizar a mistura de amplificação em agitador tipo *vortex* e centrifugar brevemente (pulso).
- Certifique-se de congelar os volumes restantes dos reagentes não utilizados logo após a utilização.

### PROCEDIMENTO DE AMPLIFICAÇÃO

1. Dispensar 15 µL da mistura de amplificação (TAMPÃO UP + PS UP + EZ UP) em cada poço da microplaca.
2. Homogeneizar e adicionar 10 µL de cada amostra extraída, do Controle Negativo extraído e do Controle Positivo.
3. Selar a microplaca.
4. Homogeneizar a placa em *vortex* e centrifugar brevemente.
5. 4. Colocar a placa no equipamento.
6. 5. Após configurar as operações descritas no subitem “Programação da PCR”, iniciar a corrida no termociclador.



### Programação da PCR

A programação deve ser feita conforme descrito abaixo.

Etapa	Temperatura	Tempo	# Ciclos
<b>Hold</b>	50°C	15 min.	1
<b>Hold</b>	94°C	1 min.	1
<b>Ciclo PCR</b> (*Coleta de Dados)	94°C	8 seg.	40
	60°C (*)	1 min.	

**AVISO:** Configurar o equipamento com a correta programação da PCR seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

### Seleção de Detectores

Selecionar os detectores informados na tabela abaixo, conforme o manual de instrução do equipamento a ser utilizado.

Primers e Sondas	Patógeno	Reporter
<b>PS UP 1</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	FAM
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	VIC
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	ROX
	mCMV (CI)	CY5
<b>PS UP 2</b>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	FAM
	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	VIC
	<i>Ureaplasma parvum</i>	ROX
	<i>Mycoplasma hominis</i>	CY5

### 13. GABARITO DE TESTE

Exemplo de gabarito para posicionamento das amostras e controles para a análise com o kit.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	CP1	CN
B	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	CP2	CN
C												
D												
E												
F												
G												
H												

#### LEGENDA:

A1 – A10 = Amostras;

CP = Controle Positivo;

CN = Controle Negativo.

FUNDO AMARELO = Mistura de amplificação (TAMPÃO UP + PS UP 1 + EZ UP)

FUNDO VERDE = Mistura de amplificação (TAMPÃO UP + PS UP 2 + EZ UP)

## 14. PROGRAMAÇÃO DO EQUIPAMENTO

Ligar o equipamento ABI® 7500 e posteriormente ligar o computador.



### COMO CONFIGURAR UMA CORRIDA NO ABI 7500:

Se utilizar o equipamento ABI® 7500 Fast, NÃO utilizar o programa rápido.

1. Na área de trabalho, clicar no ícone do software ABI® 7500 para iniciar o programa.



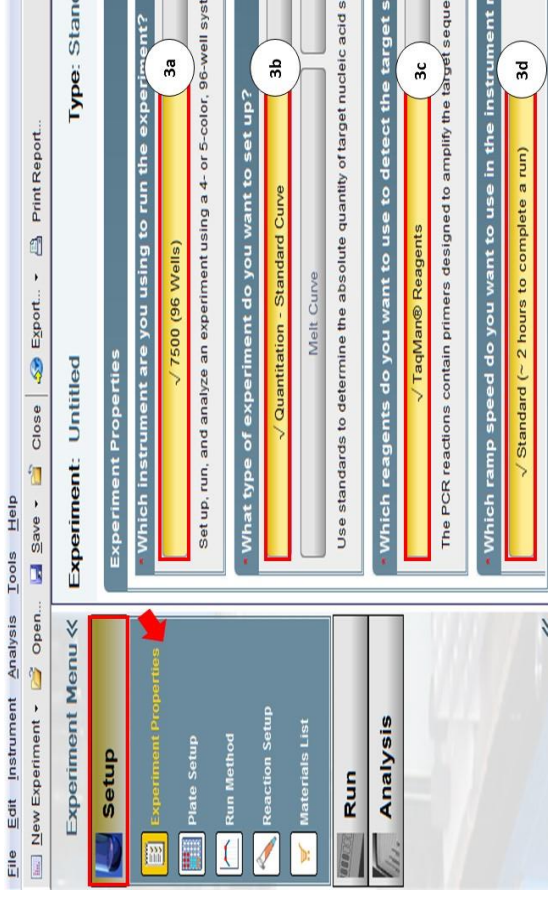
2. No menu superior, escolher a opção: “New Experiment”.



3. No menu esquerdo, escolher a opção “Setup” > “Experiment Properties”:

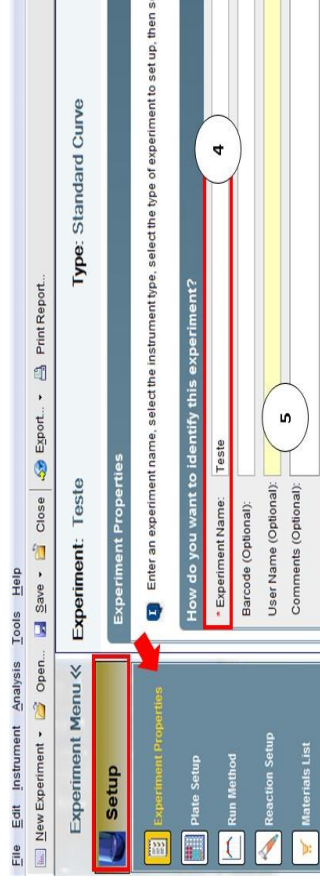
As seguintes opções devem ser selecionadas:

- Instrumento: “7500 (96 Wells)” .
- Tipo de experimento: “Quantitation – Standard Curve” .
- Tipo de reagente: “TaqMan® Reagents” .
- Rampa de velocidade: “Standard (~2 hours to complete a run)” .



4. Editar “Experiment Name” = Nome de experimento.

5. É opcional inserir código de barras, nome de usuário e comentários.



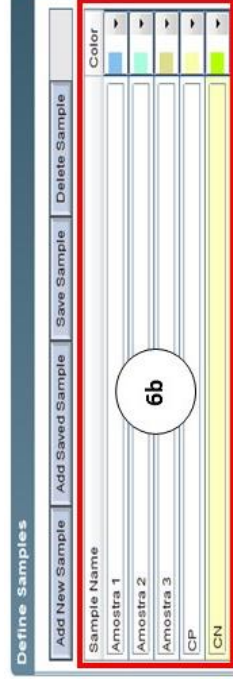
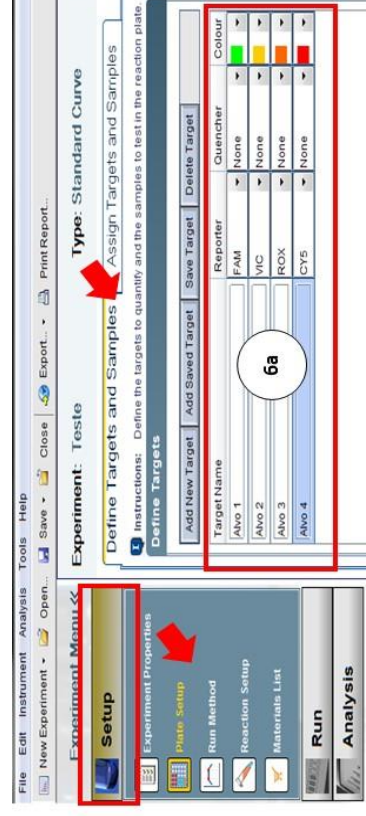
6. No menu esquerdo, escolher a opção “Setup” > “Plate Setup”. Na aba “Define Targets and Samples” definir alvos e amostras:

a) Definir os alvos: alterar nome em “Target name”, selecionar o “Reporter”, selecionar o “Quencher” conforme Item 12 – Seleção de Detectores.

Para inserir novo alvo, clicar em “Add New Target”.

**NOTA:** recomenda-se a aplicação de cores próprias para cada repórter. (FAM= verde; ROX= laranja; VIC= amarelo; Cy5= vermelho).

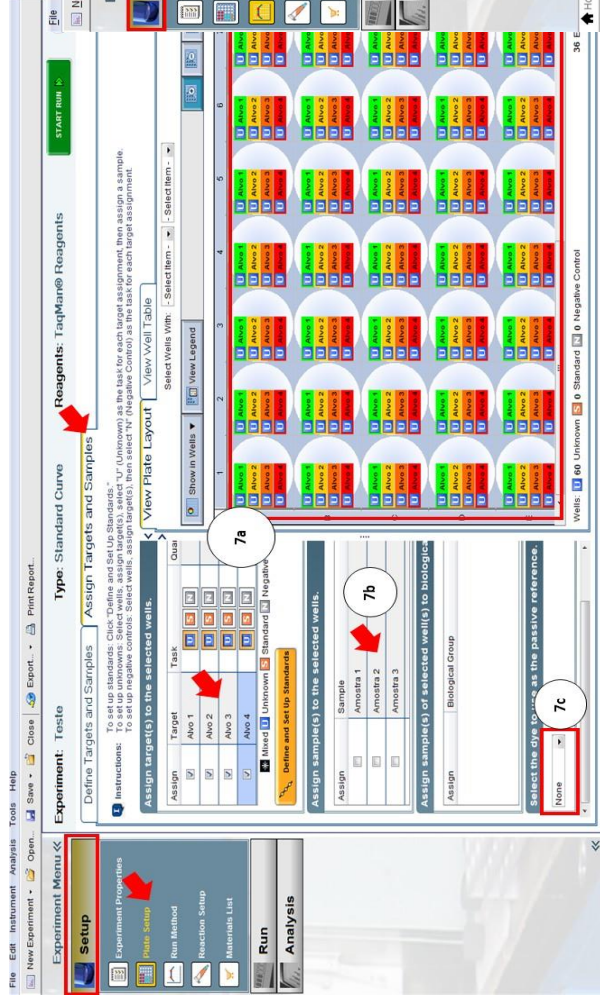
b. Nomear as amostras conforme o mapa de trabalho.





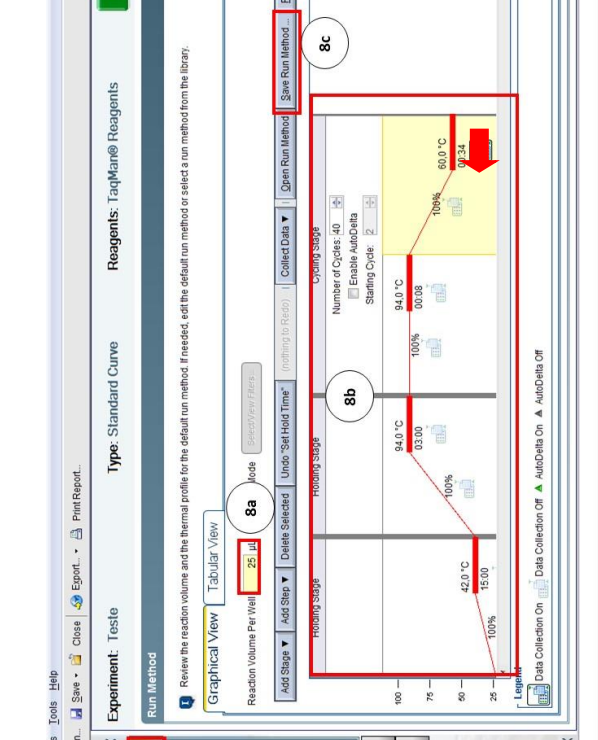
7. No menu esquerdo, escolher a opção “Setup” > “Plate Setup”. Na aba “Assign Targets and Samples” especificar os alvos e amostras:

- Escolher os poços da placa e selecionar os alvos correspondentes ao teste.
- Nomear as amostras escolhendo o poço e nome da amostra.
- Selecionar a referência passiva para “None”.



- Alterar “Reaction Volume Per Well” = volume de reação por poço (25 µl).
- Modificar diferentes fases/temperaturas/tempos conforme protocolo Item 12 – Programação da PCR.

c) Pressionar “Save Run Method” e inserir um nome. Pressionar “Save”. (Na próxima corrida de PCR, o programa da corrida estará salvo em “Open Run Method”).



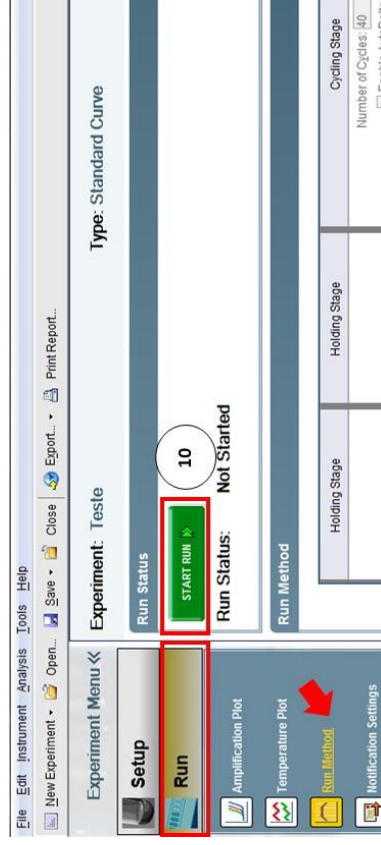
8. No menu esquerdo, escolher a opção “Setup” > “Run Method” e configurar o programa de amplificação:

**IMPORTANTE:** A coleta de dados deve estar selecionada corretamente na etapa final de amplificação (“Data Collectin On”).

9. Abrir o equipamento ABI® 7500 e colocar a microplaca.



10. Fechar o termociclador e no menu esquerdo, escolher a opção “Run” > “Run Method”. Pressionar “Start Run”. Então, salvar a corrida em uma pasta definida.



Ao final do protocolo, desligar o equipamento ABI® 7500 caso não seja mais utilizado no dia.

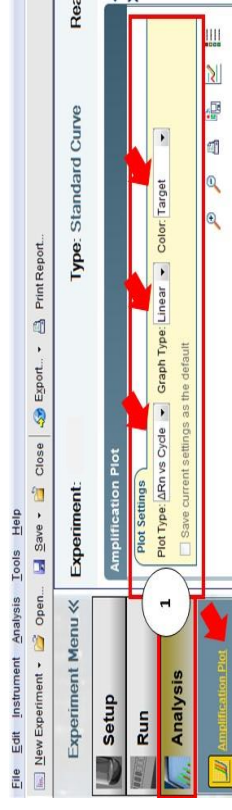
## 15. CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

### 15.1 Configurações Pré-Análise no ABI 7500:

Os parâmetros *baseline* e *threshold* devem ser configurados para correta análise dos resultados.

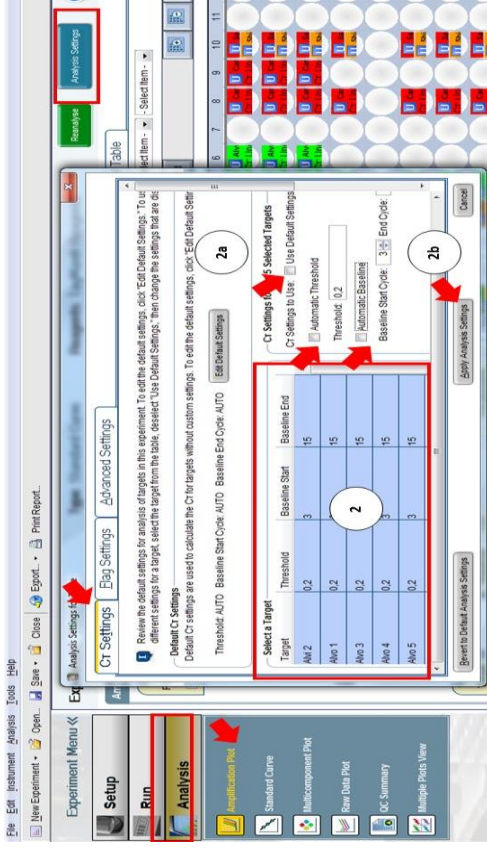
Selecionar o experimento para análise:

1. No menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Amplification Plot”. Selecionar no campo “Plot Settings” as seguintes opções: “ $\Delta Rn$  vs Cycle”, “Linear” e “Target”.



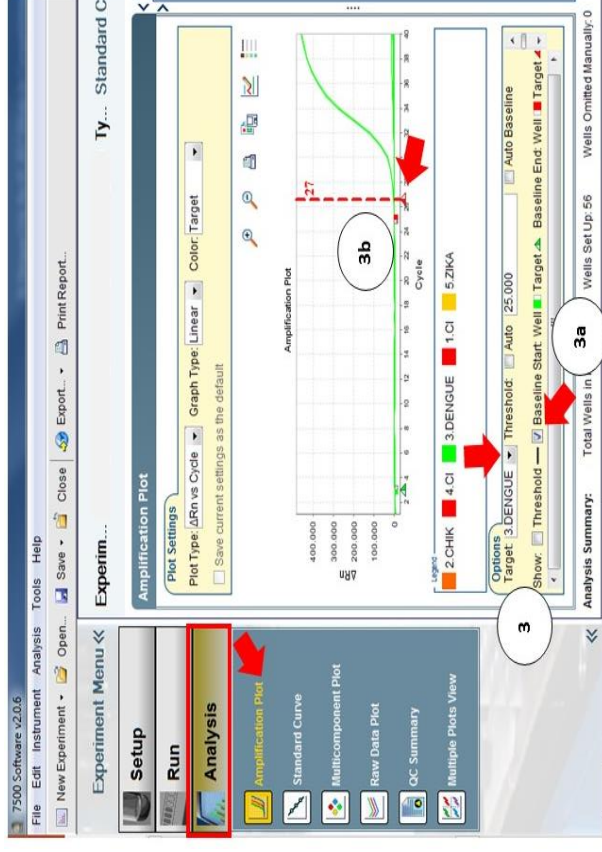
2. Para iniciar os ajustes dos parâmetros de análise, selecionar o ícone “Analysis Settings”. Na aba “Ct Settings” no campo “Select a Target” selecionar todos os alvos do teste:

- a) Desmarcar “Use Default Settings, Automatic Threshold e Automatic Baseline”.
- b) Clicar em “Apply Analysis Settings”.



3. Ajuste de baseline: no menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Amplification Plot”. No campo “Options” escolher um “Target” (alvo) de cada vez, então iniciar o ajuste manual do baseline final. A placa inteira deverá estar selecionada para este ajuste.

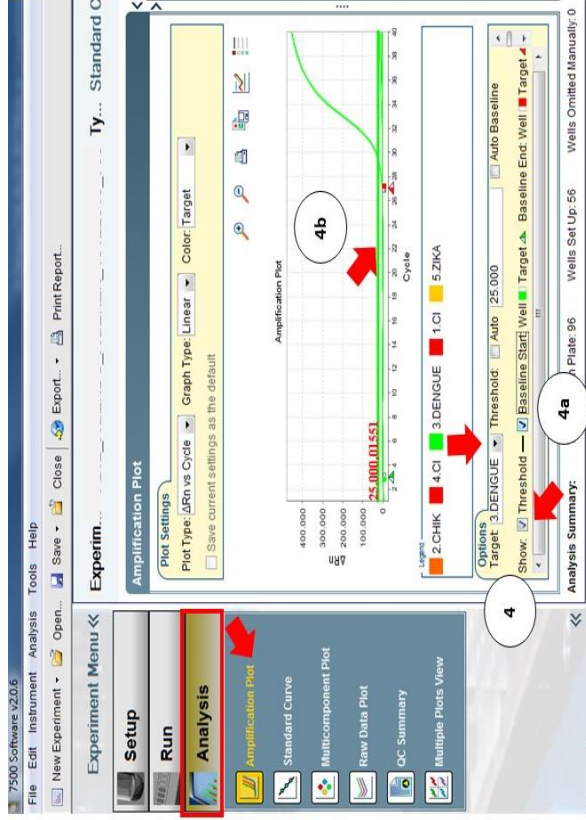
- Selecionar a opção “Baseline Start”.
- Arrastar a flecha vermelha com o mouse no plot de amplificação até um 1 Ct antes da primeira da curva de amplificação.



4. Ajuste de threshold: no menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Amplification Plot”. No campo “Options” escolher um “Target” (alvo) de cada vez, então iniciar o ajuste manual do threshold. A placa inteira deverá estar selecionada para este ajuste.

- Selecionar a opção “Threshold”.
- Definir o threshold no ponto de inflexão da curva, selecionando aquele valor que exclua o ruído (background):





**IMPORTANTE:** após o ajuste universal do *threshold*, verificar por amostra se os valores setados estão bem definidos. Caso necessário, pode ser realizado o ajuste deste parâmetro por amostra.

## 15.2 Validação da Corrida no ABI 7500

Após configuração de *threshold* e *baseline*, no menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Amplification Plot”. Checar em “View Plate Layout” ou em “View Well Table” o Ct do(s) Controle(s) Positivo(s), Negativo(s) e Internos.

Validar a corrida como descrito na tabela abaixo:

ABI SDS 7500			
Critério	Alvos	Controle Interno	Resultado do Ensaio
Controle Negativo	Ct Indeterminado/Não detectado	Ct < 33 <sup>(3)</sup>	Válido
	Ct Determinado/Detectado <sup>(1)</sup>	Ct < 33 <sup>(3)</sup>	Inálido
	Ct Indeterminado/Não detectado	Ct > 33	Inálido
Controle Positivo	Ct < 33 <sup>(2,4)</sup>	Indeterminado/Não detectado	Válido
	Ct > 33 <sup>(2,4)</sup>	Indeterminado/Não detectado	Inálido

### NOTA:

<sup>1</sup> Se existir potencial contaminação (aparecimento de curva de amplificação ou conjunto de curvas em amostras com alto Ct, por exemplo, acima de 36) na amostra Controle Negativo, os resultados obtidos não são interpretáveis e toda a corrida (incluindo extração) deve ser repetida.

<sup>2</sup> Verificar o traço do “componente” antes de aceitar o traço exponencial como verdadeiro. Os Controles Positivos e qualquer amostra positiva irá

mostrar um traçado de fluorescência exponencial. Qualquer amostra exibindo um traço exponencial é considerada como positiva.

<sup>3</sup> Todos os Controles Internos devem apresentar traço positivo (ou seja, exponencial) de amplificação. Se o Controle Interno apresentar Ct acima de 33, isso aponta para problema de purificação ou amostra fortemente positiva, causando a inibição do Controle Interno.

<sup>4</sup> As sondas possuem diferentes níveis de fluorescência, por isso as curvas para diferentes alvos apresentam aspectos diferentes.

Se todos os controles estiverem dentro dos intervalos especificados, validando a corrida, checar as amostras clínicas.

### 15.3 Análise das Amostras Clínicas no ABI 7500

O usuário deve realizar uma análise cuidadosa no gráfico “Amplification Plot” e “Multicomponent Plot” em cada amostra e para todos os alvos após os parâmetros serem configurados, para confirmar a presença ou ausência do traço exponencial.

Analisar os resultados das amostras como descrito na tabela abaixo:

ABI SDS 7500		
Critério	Alvos	Resultado
Amostra	Ct Determinado/Detectado (1,3)	Ct < 33 <sup>(2)</sup>  Amostra Positiva Válida

Ct Indeterminado/Não detectado	Ct < 33 <sup>(2)</sup>	Amostra Negativa Válida <sup>(4)</sup>
	Ct Indeterminado/Não detectado	Ct Indeterminado/Não detectado

#### NOTA:

<sup>1</sup> Verificar o traço do “componente” antes de aceitar o traço exponencial como verdadeiro. Os Controles Positivos e qualquer amostra positiva irá mostrar um traçado de fluorescência exponencial. Qualquer amostra exibindo um traço exponencial é considerada como positiva.

<sup>2</sup> Todos os Controles Internos devem apresentar traço positivo (ou seja, exponencial) de amplificação. Se o Controle Interno apresentar Ct acima de 33, isso aponta para problema de purificação ou amostra fortemente positiva, causando a inibição do Controle Interno.

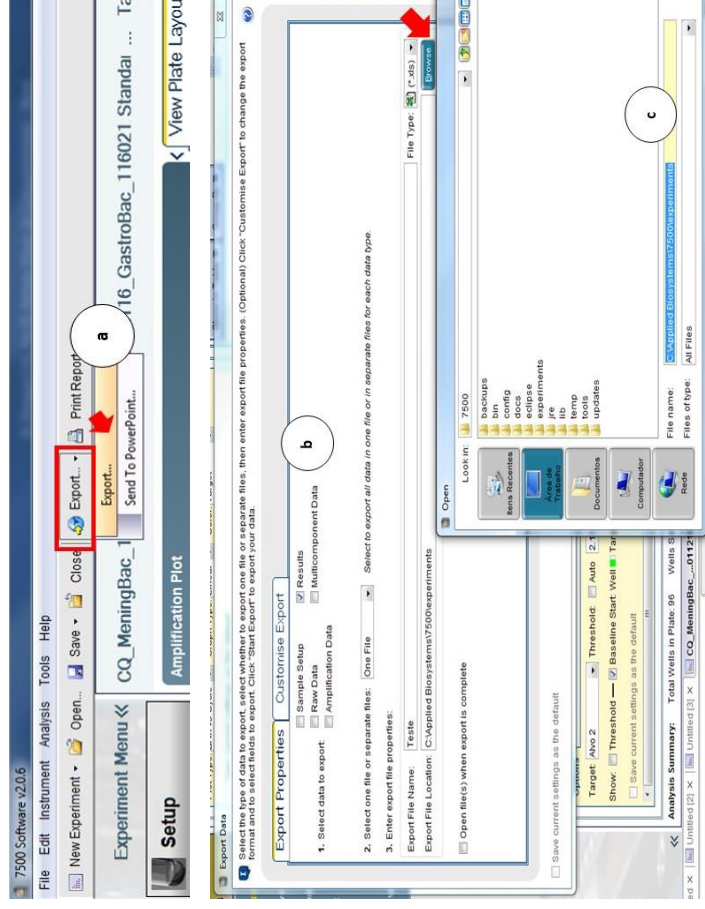
<sup>3</sup> As sondas possuem diferentes níveis de fluorescência, por isso as curvas para diferentes alvos apresentam aspectos diferentes.

<sup>4</sup> O resultado negativo pode ser devido a ausência do alvo na amostra ou a presença de uma quantidade de cópias abaixo do limite de detecção do kit.

**IMPORTANTE: Se após ajuste dos *thresholds* permanecerem amostras dúbias acima da linha de corte (alvo com amplificação tardia e/ou curva de amplificação não definida, sendo confundida com ruído), verificar Item 15.4 para melhor interpretação do resultado.**

Após análise, para registro dos resultados, o usuário pode exportar os dados em planilha excel.

- a) No menu superior, selecionar a opção “Export” > “Export” .
- b) Selecionar as opções na tela “Export Data” conforme preferências.
- c) Em “Browse” indicar a pasta escolhida para salvar o arquivo.



#### 15.4 Interpretação de Amostra dúbria:

Para verificar a veracidade da curva do alvo dúbio, as telas “Amplification Plot”, “Multicomponent Plot” e “Raw Data Plot” do menu esquerdo “Analysis” poderão ser analisadas.

Após esclarecer o resultado das amostras dúbias, o usuário deve realizar o ajuste de *threshold* para adequação dos valores de Ct, positivamente (abaixando o *threshold*) ou negativamente (subindo o *threshold*) as amostras que foram analisadas.

Se após estas verificações, o resultado ainda ficar duvidoso, repetir a amostra de preferência com nova extração.

**Análise na tela “Amplification Plot”:** ajustar o baseline inicial para normalização do ruído.

No menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Amplification Plot”. No campo “Options” escolher o “Target” (alvo) dúbio, então iniciar o ajuste manual do baseline inicial. A placa inteira deverá estar selecionada para este ajuste.

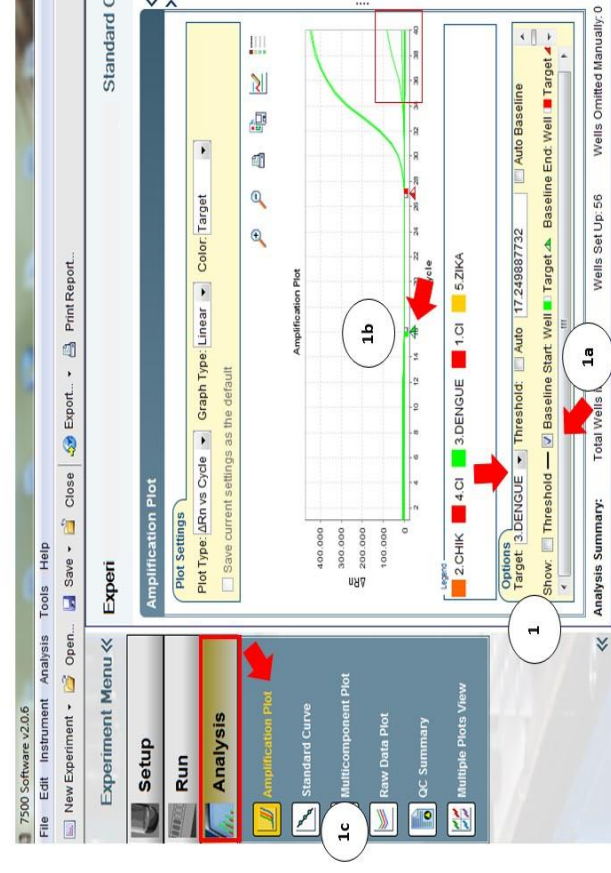
a) Selecionar a opção “Baseline Start” .

b) Arrastar a flecha verde com o *mouse* no plot de amplificação de modo que haja a compactação do ruído nos ciclos finais de

amplificação. Esse ajuste deve ser mantido apenas se houver compactação do ruído.

c) Após o ajuste do baseline, realizar a análise do “Multicomponent Plot”.

Identificação	AZUL	VERDE	VERMELHO	ROXO
Corante	FAM	VIC	ROX	CY5



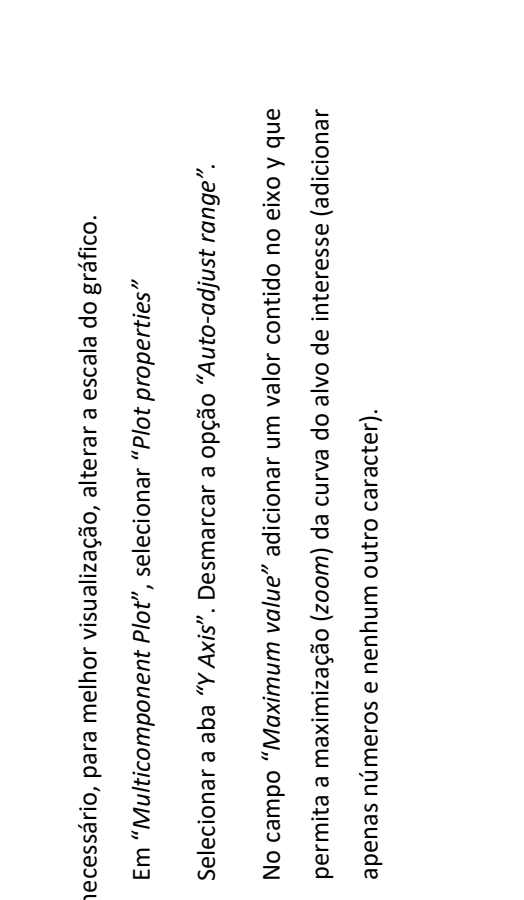
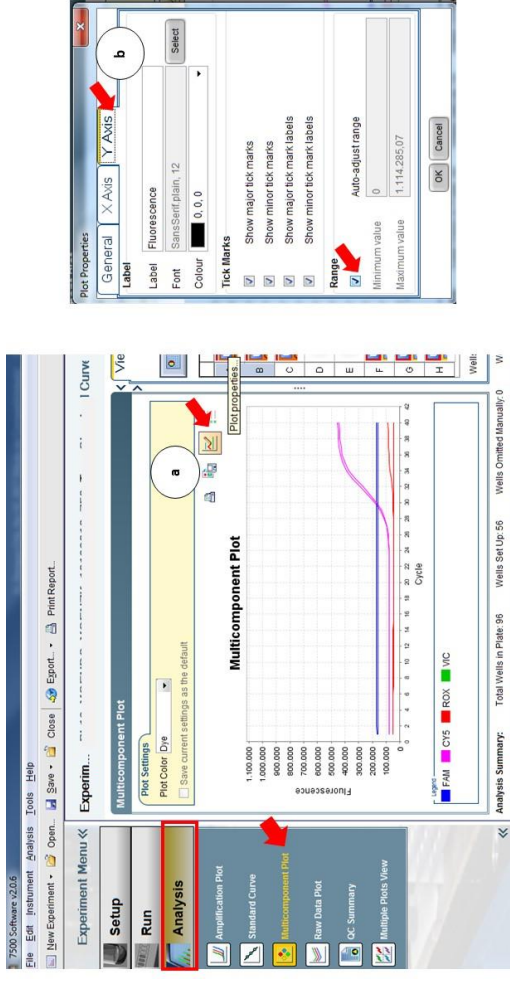
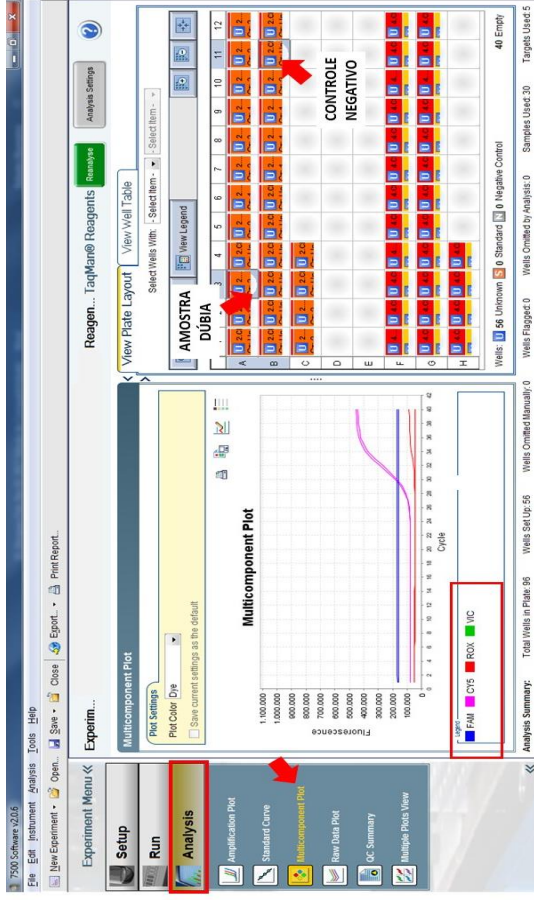
No menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Multicomponent Plot”. A amostra dúbia e o controle negativo deverão estar selecionados para comparação da fluorescência do corante na qual o alvo está marcado.

- Amostra positiva: apresenta aumento de fluorescência exponencial, com a curva acima da linha reta do controle negativo (sem aumento na fluorescência).
- Amostra negativa: apresenta mesmo perfil do controle negativo (linha reta, sem aumento de fluorescência).

NOTA: o controle negativo deve estar validado de acordo com o item 15.2.

2. **Análise na tela “Multicomponent Plot”**: analisar a contribuição espectral de cada corante na amostra no final da amplificação. Na tabela abaixo, segue as correspondências de corante e cores dos gráficos:



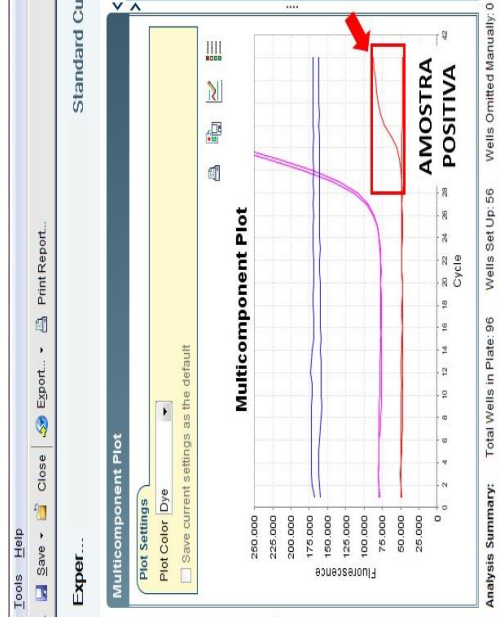


Se necessário, para melhor visualização, alterar a escala do gráfico.

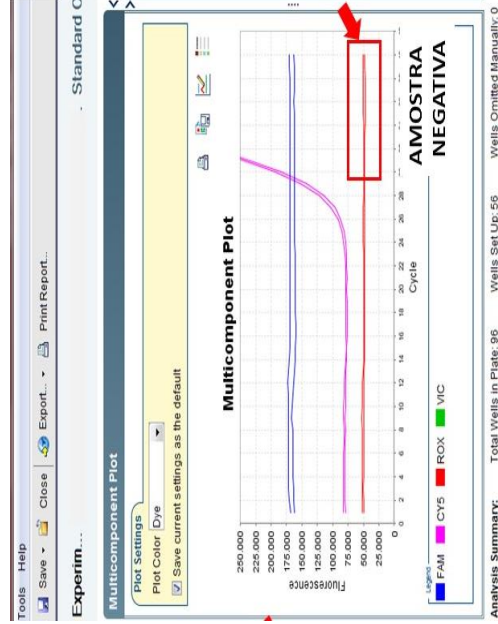
- Em "Multicomponent Plot", selecionar "Plot properties"
- Selecionar a aba "Y Axis". Desmarcar a opção "Auto-adjust range".
- No campo "Maximum value" adicionar um valor contido no eixo Y que permita a maximização (zoom) da curva do alvo de interesse (adicionar apenas números e nenhum outro caracter).



Exemplo de amostra positiva:



Exemplo de amostra negativa:

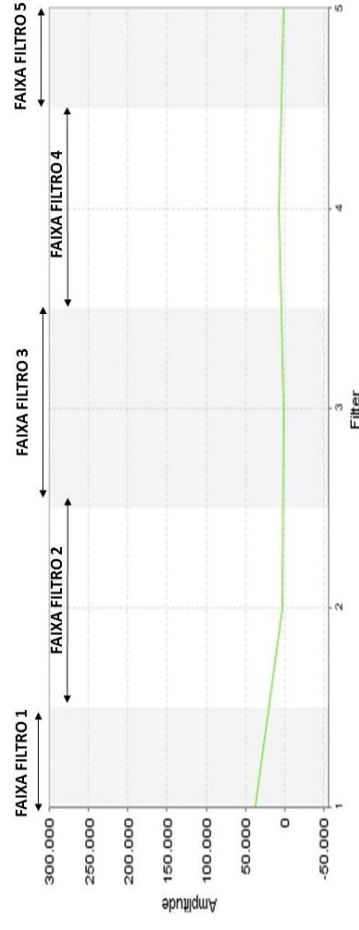


Se a análise do “Multicomponent Plot” não for suficiente para esclarecer a dúvida, analisar a tela “Raw Data Plot”.

- Análise na tela “Raw Data Plot”:** analisar a fluorescência não normalizada de cada filtro óptico durante a amplificação. Na tabela abaixo, segue as correspondências de corante e filtros:

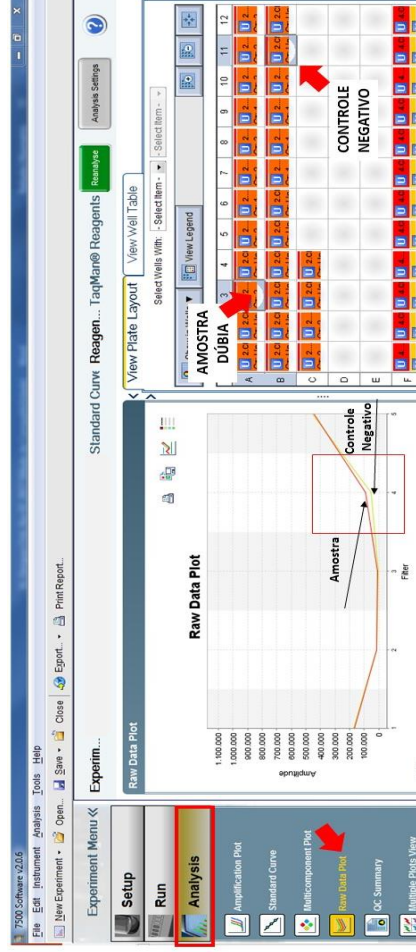
Filtro	1	2	3	4	5
Corante	FAM	VIC	---	ROX	Cy5

Para a análise do dado duvidoso verificar o quadrante referente ao filtro alvo.



No menu esquerdo, escolher a opção “Analysis” > “Raw Data Plot”. A amostra dúbia e o controle negativo deverão estar selecionados para comparação da fluorescência no filtro específico.

- Amostra positiva: apresenta linha de fluorescência acima da linha do controle negativo.
- Amostra negativa: apresenta mesmo perfil de fluorescência do controle negativo ou linha de fluorescência abaixo do controle negativo.

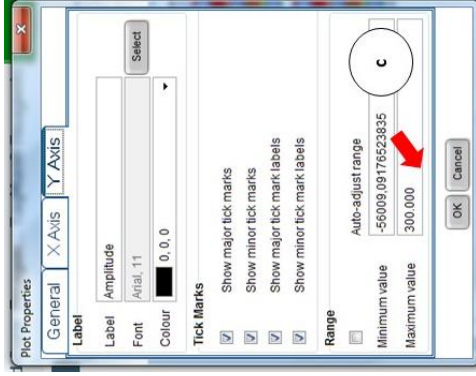


Se necessário, para melhor visualização, alterar a escala do gráfico.

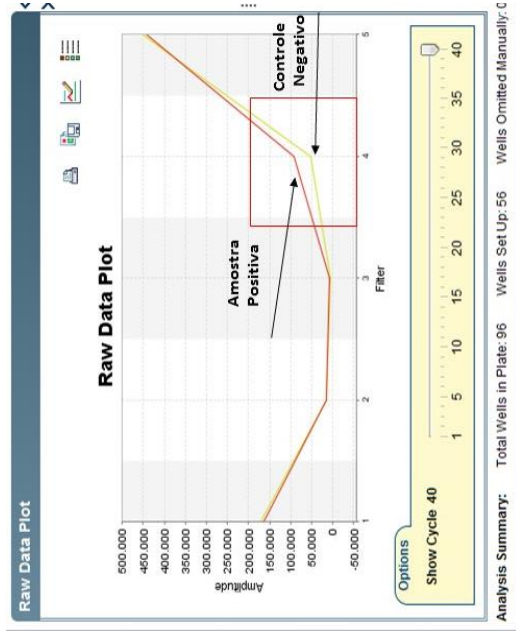
- Em “Raw Data Plot”, selecionar “Plot properties”
- Selecionar a aba “Y Axis”. Desmarcar a opção “Auto-adjust range”.

- No campo “Maximum value” adicionar um valor contido no eixo y que permita a maximização (zoom) da curva do alvo de interesse (adicionar apenas números e nenhum outro caracter).

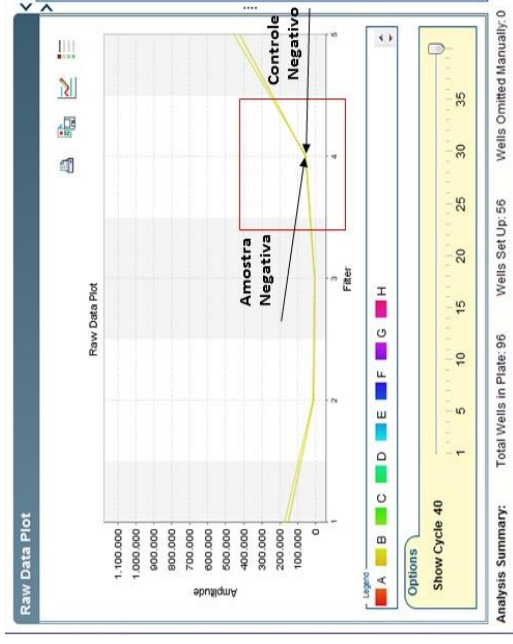




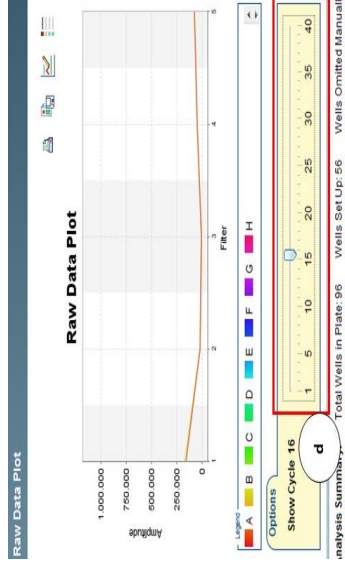
Exemplo de amostra positiva:



Exemplo de amostra negativa:



- d) O usuário pode também movimentar a indicação de ciclo e acompanhar o aumento de fluorescência no decorrer da reação.





## 16. SOLUÇÃO DE PROBLEMAS

### CONTROLE POSITIVO SEM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO

- Configuração incorreta da temperatura na programação da PCR no equipamento.
- Comparar se a configuração está de acordo com a instrução de uso.
- Configuração incorreta da reação de PCR.
  - Verificar as etapas de trabalho por meio do esquema de pipetagem e repetir o procedimento, se necessário.
  - Checar a calibração das micropipetas.
- Manuseio incorreto dos controles positivos.
  - Homogeneização inadequada ou descongelamento em temperatura diferente da ambiente.
- Condições de armazenamento para um ou mais componentes do kit não estão de acordo com a instrução de uso ou a data de validade do kit expirou.
  - Checar as condições de armazenamento e a data de validade (verificar na etiqueta do produto) dos reagentes e repetir o procedimento, se necessário.

### CONTROLE INTERNO COM SINAL FRACO OU SEM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO

- As condições da PCR não cumprem o protocolo.
  - Verificar as condições da PCR e repetir o procedimento de acordo com a instrução de uso, se necessário.
- A PCR foi inibida, não houve adição ou o volume de Controle Interno adicionado na etapa de extração não foi suficiente.

- Verificar se o método de extração utilizado é compatível com o kit.
- Sinal positivo muito forte de um alvo pode, por vezes, inibir a fluorescência do Controle Interno.

### CONTROLE NEGATIVO COM SINAL DE AMPLIFICAÇÃO

- Contaminação durante a extração ou durante a preparação da PCR.
  - Repetir a PCR com novos reagentes em replicatas.
  - É recomendado realizar a pipetagem do Controle Positivo após todos os outros reagentes.
- Certificar-se de que o local de trabalho e os instrumentos são descontaminados em intervalos regulares.

**IMPORTANTE: A interpretação dos resultados deve ser feita sob a supervisão do responsável do laboratório para reduzir o risco de erros e resultados mal interpretados.**

Quando os resultados do laboratório são transmitidos do laboratório para o centro de informática, deve-se prestar muita atenção para evitar erro na transferência de dados.

Se um ou mais dos problemas descritos na lista acima acontecer, depois de verificá-los, informe qualquer problema residual ao supervisor para futuras ações.

## 17. LIMITAÇÕES

Para o usuário deste kit recomenda-se a leitura cuidadosa e a compreensão da instrução de uso. A adesão estrita ao protocolo é necessária para a obtenção de resultados confiáveis.





Em particular, a veracidade da amostra, a pipetagem de reagentes, a aplicação do fluxo de trabalho correto, juntamente com a etapa da programação cuidadosa do termociclador, é essencial para que a detecção do ácido nucleico dos patógenos seja precisa e reproduzível. A determinação do ácido nucleico destes patógenos em uma amostra do paciente tem implicações médicas, sociais, psicológicas e econômicas.

Os resultados obtidos com o **Kit XGEN MULTI UP** devem ser interpretados pelos responsáveis do laboratório levando em consideração os sintomas clínicos dos pacientes e outros parâmetros de laboratório relacionados às condições do paciente.

É recomendado que a confidencialidade, aconselhamento apropriado e avaliação médica sejam considerados aspectos essenciais na sequência dos testes.

#### **18. GARANTIA DA QUALIDADE**

A Mobius Life Science fornece garantia de todos os produtos por ela revendidos dentro dos seguintes termos:

##### GARANTIA

O produto **Kit XGEN MULTI UP** é garantido pela Mobius contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.

##### EXCEÇÕES NA GARANTIA

- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.

##### EXTINÇÃO DA GARANTIA

- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

#### **19. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE**

Mobius Life Science Comércio de Produto para Laboratórios Ltda.

Rua Paraíso do Norte, 866 – Pinhais – PR - CEP: 83.324-221.

Telefone: (41) 3401-1850 / 0800-7101850

E-MAIL: [info@mobiuslife.com.br](mailto:info@mobiuslife.com.br) | WEBSITE: [www.mobiuslife.com.br](http://www.mobiuslife.com.br)

CNPJ: 04.645.160/0001-49

#### **20. REGISTRO ANVISA**

80502070044

#### **21. RESPONSÁVEL TÉCNICA**

Flávia Rosenstein Schiel

CRBio-07 34.360/07-D