

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE PATÓGENOS SEXUALMENTE  
TRANSMISSÍVEIS EM MULHERES COM CITOLÓGICO NORMAL**

**Filipe Magalhães dos Santos, FAPEAM.**

**MANAUS  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RELATÓRIO FINAL - PIB-S/0172/2013**

**DETECÇÃO MOLECULAR DE *Neisseria gonorrhoeae* EM MULHERES  
COM CITOLOGIA NORMAL**

**Filipe Magalhães dos Santos, FAPEAM**

**Orientadora: Prof. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos**

**MANAUS  
2014**

## RESUMO

As DST estão entre as doenças infecciosas mais comuns e são transmitidas por meio do contato sexual. De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), estima-se que, anualmente, 448 milhões de DST ocorram em todo o mundo e que, só no ano de 2012, cerca de 335.000 destes casos foram notificados nos Estados Unidos sendo que 50% corresponderam à gonorréia. No Brasil, os estudos relacionados à gonorreia são escassos, e os poucos existentes revelam elevada incidência da doença em mulheres que residem nas grandes capitais, bem como gestantes e pacientes atendidas na rede pública de saúde. A *Neisseria gonorrhoeae* ou Gonococo é uma bactéria sexualmente transmissível do tipo diplococo Gram-negativo, não flagelado, encapsulado e que não forma esporos. É o agente responsável pela gonorréia, caracterizada por ser uma doença infecciosa do trato urogenital que acomete tanto homens quanto mulheres. A infecção pode muitas vezes ser assintomática, contudo, no caso das mulheres, os sintomas predominantes são a cervicite, corrimento vaginal e disúria que, se não tratadas a tempo representam dano potencial e ascendente ao cólo do útero, propiciando a gravidez ectópica, dor crônica e até mesmo a infertilidade. O diagnóstico considerado padrão-ouro para detecção de *N. gonorrhoeae* é a cultura bacteriana. Entretanto, as amostras cervicais e uretrais também podem ser utilizadas para detecção da bactéria, sendo o corrimento uretral fonte mais abundante do Gonococo. Tendo em vista o advento da biologia molecular, uma ferramenta diagnóstica alternativa que vem avançando na área da saúde é o diagnóstico molecular. Nesse contexto, este projeto objetivou diagnosticar a nível molecular o patógeno *N. gonorrhoeae* através do método de PCR convencional, em 164 mulheres com citologia normal atendidas pelo serviço de uma clínica da Rede Básica de Saúde da cidade de Manaus. O par de primers utilizados neste processo amplifica a região do pseudogene *porA*. As pacientes analisadas não apresentaram infecção por *Neisseria gonorrhoeae*. Não foi possível relacionar as características sócio-demográficas à infecção por *N. gonorrhoeae*. É necessário a realização de estudos com fins comparativos de métodos diagnósticos para o patógeno em questão para definirmos se o método molecular pode ser considerado uma alternativa de diagnóstico a ser inserido na rede de saúde pública.

**Palavras-Chaves:** Diagnóstico Molecular; *Neisseria gonorrhoeae*; PCR convencional.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. OBJETIVOS.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1 Tipo de Estudo, População, Amostra e Critérios de Seleção.....	10
4.2 Extração de DNA genômico.....	10
4.3 Quantificação e Padronização do DNA.....	10
4.4 Amplificação controle do DNA Humano.....	10
4.5 Detecção molecular de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
6. CONCLUSÕES.....	16
REFERÊNCIAS BILIOGRÁFICAS.....	17

## 1. INTRODUÇÃO

As Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) têm como característica principal a transmissão através de práticas sexuais, havendo assim, muitas vezes, tabus, desinformação, vergonha e preconceito que dificultam e atrasam seu reconhecimento e a busca precoce por assistência, o que as caracterizam como um dos problemas mais comuns em todo mundo na área da saúde, acarretando uma maior procura por serviços de saúde pública nos países em desenvolvimento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

As mulheres possuem características específicas nas complicações causadas pelas DST, principalmente por não desenvolverem sintomas significativos. Aproximadamente, 90% das mulheres nessa condição permanecem sem que haja a identificação da doença. Tais patologias são relacionadas como um veículo facilitador e disseminador de outras infecções, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Uma das doenças mais problemáticas e mais antigas relatadas pela humanidade é a Gonorreia, causada pela *Neisseria gonorrhoeae* e transmitida quase que exclusivamente por contato sexual ou perinatal (PENNA *et al.*, 2010).

No Brasil, poucos são os estudos relacionados à gonorreia, os que existem, mostram um grande índice desta infecção em mulheres das principais capitais do país, incluindo gestantes e frequentadoras da rede de saúde pública (BENZAKEN *et al.*, 2010).

Quando se trata da Região Norte do país, a escassez de dados epidemiológicos reflete na necessidade de estudos que demonstrem a real situação encontrada.

Este estudo é bastante relevante para verificar o quadro epidemiológico da população de mulheres atendidas na Policlínica Castelo Branco, as quais podem ter infecções subclínicas sem evidência de sintomas relevantes e que possam gerar complicações posteriores, dando continuidade a um “ciclo” de patologias correlacionadas a infecções por gonorreia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral:**

✓ Realizar o diagnóstico molecular da *Neisseria gonorrhoeae* em um grupo de mulheres com diagnóstico citológico normal/inflamatório.

### **2.2. Específicos:**

✓ Relacionar os resultados da detecção molecular da *Neisseria gonorrhoeae* com os dados clínicos e comportamentais e as variáveis sócio-demográficas das mulheres analisadas no estudo.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos últimos anos, as DST têm sido um grande problema de saúde pública por sua magnitude, dificuldade de diagnóstico e, por ser o principal agente facilitador da disseminação do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Em 1999, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou um total de 340 milhões de casos novos de DST curáveis em todo o mundo, comprometendo principalmente a população jovem entre 15 e 49 anos, sendo de todos os casos no mundo, 10 a 12 milhões são registrados apenas no Brasil (MISTERIO DA SAÚDE, 2014).

As DST estão entre as principais causas de busca de assistência médica no mundo, suas consequências podem ser observadas nos âmbitos econômicos, sociais e sanitários. Algumas dessas doenças afetam diretamente a vida sexual e reprodutiva de mulheres, podendo causar algumas complicações potencialmente graves principalmente nas mulheres, como o alto risco de abortos, natimortalidade, Doença Inflamatória Pélvica (DIP) e infertilidade (BENZAKEN *et al.*, 2010).

*Neisseria gonorrhoeae* ou Gonococo é um diplococo Gram-negativo, não flagelado, não formador de esporos, encapsulado, anaeróbio facultativo, com diâmetro entre 0,6 a 1,06 µm e, quando coradas pelo Gram, apresentam-se à microscopia óptica como duas estruturas justapostas, espelhadas pelas suas concavidades e aproximadas pela extremidade (aparência de rins), quase sempre agrupadas no espaço extracelular e/ou citoplasma de polimorfonucleares abundantes. O Gonococo possui envelope celular composto de três camadas: uma membrana citoplasmática interna, parede celular de peptidoglicanas e membrana externa. A camada de peptidoglicanas também contribui para a resposta inflamatória. As toxinas liberadas pela resposta inflamatória podem causar danos as tubas uterinas levando a infertilidade (THAYER JD *et al.*, 1966; HECKELS, 1984; PENNA *et al.*, 2010).

Assim que o contato sexual com o parceiro hospedeiro do patógeno é feito, e com os mecanismos de defesas e imunológicos vencidos, e em período de incubação relativamente curto (2 a 5 dias), a infecção evoluirá para doença. Nas mulheres que apresentam sintomas, estes aparecem cerca de 10 dias após o contato sexual com parceiro infectado. Os sintomas predominantes incluem a cervicite, corrimento vaginal e disúria. Se não tratada, a infecção ascendente pode ocorrer entre 10 a 20% dos casos de mulheres infectadas podendo resultar em DIP, que pode manifestar-se como salpingite, endometrite, abscesso tubo-ovariano, que pode levar a gravidez ectópica, esterilidade e dor crônica (SCHIELKE *et al.*, 2010; PENNA *et al.*, 2010).

Observa-se que as infecções não tratadas apresentavam uma resolução espontânea em alguns dias ou semanas, reinfecções são comuns. Muitos tratamentos foram utilizados, porém somente com a utilização das sulfonamidas na década de 30 e da penicilina em 1943, houve uma intervenção terapêutica eficaz no combate a doença. No entanto, a falência na cura de um caso de gonorreia tem implicações em nível de saúde pública, pelo potencial para transmissão continuada e pela rápida emergência de resistência (PENNA, *et al.*, 2010).

A proporção do problema vem se agravando cada vez mais, de uma forma que vários países em diferentes regiões do mundo, elaboraram programas de vigilância da resistência antimicrobiana para *N. gonorrhoeae*, visando monitorar, a nível nacional, a emergência e a prevalência de cepas resistentes e sua circulação (BARRETO *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007)

No Brasil, em 1996, o Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS (PNDST/AIDS), do Ministério da Saúde, começou também a implementar a Rede Nacional de Vigilância da Resistência dos Gonococos (RENAGOGO), inclusive com a contribuição de laboratórios em Manaus/AM (BARRETO *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007b).



São poucos os dados epidemiológicos dos países no mundo que permitem estimativas confiáveis da incidência da gonorreia. No Brasil, a escassez desses estudos mostra-se bastante evidentes, tanto no que se refere a dados epidemiológicos quanto a dados de eficácia terapêutica e de resistência (PENNA *et al.*, 2010).

Os maiores índices de infecções de gonorreia estão entre os jovens de 15 a 30 anos. A maioria dos casos é encontrada em homens, provavelmente por maior facilidade diagnóstica, já que 70% das mulheres infectadas permanecem assintomáticas (PENNA *et al.*, 2010).

O diagnóstico laboratorial da gonorreia, na maioria das vezes é feito através de cultura bacteriana e tem sido realizada como diagnóstico definitivo da infecção, pois além de ser de relativo baixo custo, também provê viabilidade para testar susceptibilidade aos antibióticos. (ROCHA, 2012).

O advento da biologia molecular na área da saúde vem sendo um grande avanço para realização de diagnóstico de várias doenças, dentre elas a gonorreia. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) se destaca nesse contexto, e vem se aperfeiçoando na área da Saúde, pois permite a detecção de um determinado organismo infeccioso, mesmo que esteja em quantidades muito pequenas, sendo de grande vantagem para detecção em casos específicos de pacientes assintomáticas (RODRIGUES *et al.*, 2006; WATSON *et al.*, 2009).

Em 2004 e 2005 foi realizado um estudo de prevalência de patógenos sexualmente transmissíveis envolvendo seis capitais brasileiras, utilizando vários métodos moleculares, dentre eles a captura híbrida para a detecção de *N. gonorrhoeae*. A prevalência global de gonorreia entre as mulheres foi de 3,3% (67/2057). Só em Manaus, a prevalência chegou a 8,9%, sendo a segunda prevalência mais alta. As mulheres que participaram deste estudo são frequentadoras da rede de saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

No interior do Amazonas, na cidade de Coari, outro estudo epidemiológico de 2010, utilizando PCR, mostrou que de 361 mulheres analisadas, 47% estavam infectadas por algum

patógeno sexualmente transmissível dentre eles a *Neisseria gonorrhoeae*, que apresentou um índice de 1,4% (ROCHA 2012).

Em estudo realizado na cidade de São Paulo, Pantoja et al. (2012) descreveram uma prevalência negativa para *N. gonorrhoeae* e uma prevalência de 1,1% de *Chlamydia trachomatis* em 176 mulheres candidatas ao tratamento tópico ou de fertilização *in vitro*, através da captura híbrida e PCR.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de Estudo, População, Amostra e Critérios de Seleção**

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) e aprovado sob CAAE 15409213.0.0000.5020. Trata-se de um estudo do tipo transversal cujo objetivo foi a detecção molecular de *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres com citologia normal/inflamatória. Foram analisadas 164 amostras cervicais, coletadas no período de março a julho de 2009, que foram alvo da dissertação “Co-infecção do Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis* em mulheres com citologia normal e alterada”, desenvolvida pela pesquisadora Évelyn Costa Lira.

### **4.2 Extração de DNA genômico.**

As amostras cervicais mantidas a -20°C desde sua coleta foram descongeladas à temperatura ambiente para a realização da extração do DNA através do kit de extração do DNA genômico *AccuPrep®* (Bionner), de acordo com as instruções do fabricante.

### **4.3 Quantificação e Padronização do DNA**

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria medida pela absorbância (ABS) das bases a 260 nm e 280 nm. Após a quantificação foi possível padronizar as amostras em concentração de  $\pm 10$ -20 ng/ $\mu$ L. Amostras que demonstraram concentração superior foram diluídas em TE, e as que demonstraram concentração inferior foram processadas por meio de um protocolo de concentração por acetato de amônia.

#### 4.4 Amplificação controle do DNA Humano

Para confirmar a presença do DNA cromossomal humano amplificável conservado, as amostras foram submetidas a uma Reação de Cadeia em Polimerase (PCR), utilizando um par de *primers* (ISO5G), que amplificam uma região microssatélite (GATA)<sub>13</sub> do cromossoma 15 humano e evidenciam uma banda correspondente a 270 pares de bases (PONTES *et al.*, 2003).

O sistema utilizado para esta reação, bem como as condições da reação estão descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1: Sistema de Reação utilizado na PCR para amplificação controle do DNA Humano**

PCR – DNA GENÔMICO	VOLUME
H <sub>2</sub> O	2,2 µL
Tampão 10x	2,5 µL
dNTP 2,5 mM	2,5 µL
MgCl <sub>2</sub> 10mM	2,5 µL
ISO 5G 5pMol	5,0 µL
Taq Polimerase 5pMol	0,3 µL
DNA	5,0 µL
Volume final	20,0 µL

**Tabela 2: Condições térmicas para Amplificação controle do DNA Humano em PCR**

ETAPAS	TEMPERATURA °C/ TEMPO	CICLOS
Pré-desnaturação	95°C – 2 min	1 x
<b>Desnaturação</b>	<b>95°C – 40 seg</b>	35 x
<b>Anelamento</b>	<b>60°C – 1 min</b>	
<b>Extensão</b>	<b>72°C – 1 min e 30 seg</b>	
Extensão final	72°C – 10 min	1 x
Conservação	4°C - ∞	-

#### 4.5 Detecção molecular de *Neisseria gonorrhoeae*

Após a verificação de DNA genômico, as amostras foram submetidas à detecção molecular de *Neisseria gonorrhoeae* em que se utilizou um par de *primers* desenvolvidos por Whiley *et al.* (2004), o qual amplifica o pseudogene *porA*, evidenciando um fragmento de 132 pares de base, conforme descrito na Tabela 3.

**Tabela 3: Sequencia alvo dos primers utilizados na detecção molecular de *N. gonorrhoeae***

PATÓGENO	INICIADORES	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	PapF	5' CggTTTCCgTgCgTTACgA 3'	132 pb
	PapR	5'CTggTTTCATCTgATTACTTTCCA3'	

O sistema utilizado para esta reação, bem como as condições da reação estão descritos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

**Tabela 4: Sistema de reação utilizado na PCR na detecção de *N. gonorrhoeae***

PCR – <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	VOLUME
H <sub>2</sub> O	13,6 µL
Tampão 10x	2,5 µL
dNTP 2,5 mM	0,5 µL
MgCl <sub>2</sub> 10mM	0,8 µL
PapF 5pMol	2,5 µL
PapR 5pMol	2,5 µL
Taq Polimerase 5pMol	0,1 µL
DNA	2,5 µL
<b>Volume final</b>	<b>25,0 µL</b>

**Tabela 5: Condições térmicas para amplificação da PCR de detecção da *N. gonorrhoeae***

ETAPAS	TEMPERATURA °C/ TEMPO	CICLOS
Pré-desnaturação	95°C – 5 min	1 x
<b>Desnaturação</b>	<b>95°C – 30 seg</b>	35 x
<b>Anelamento</b>	<b>55°C – 30 seg</b>	
<b>Extensão</b>	<b>72°C – 30 seg</b>	
Extensão final	72°C – 5 min	1 x
Conservação	4°C - ∞	-

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídeo (1 µg/µL), para visualização com auxílio de um transiluminador para registro em fotografia e apreciação dos resultados.

As amostras utilizadas como controle positivo para *Neisseria gonorrhoeae*, para utilização na eletroforese em gel de agarose após a PCR, foi cedida pela Fundação Alfredo da Mata (FUAM), obtida por método de cultura bacteriana.

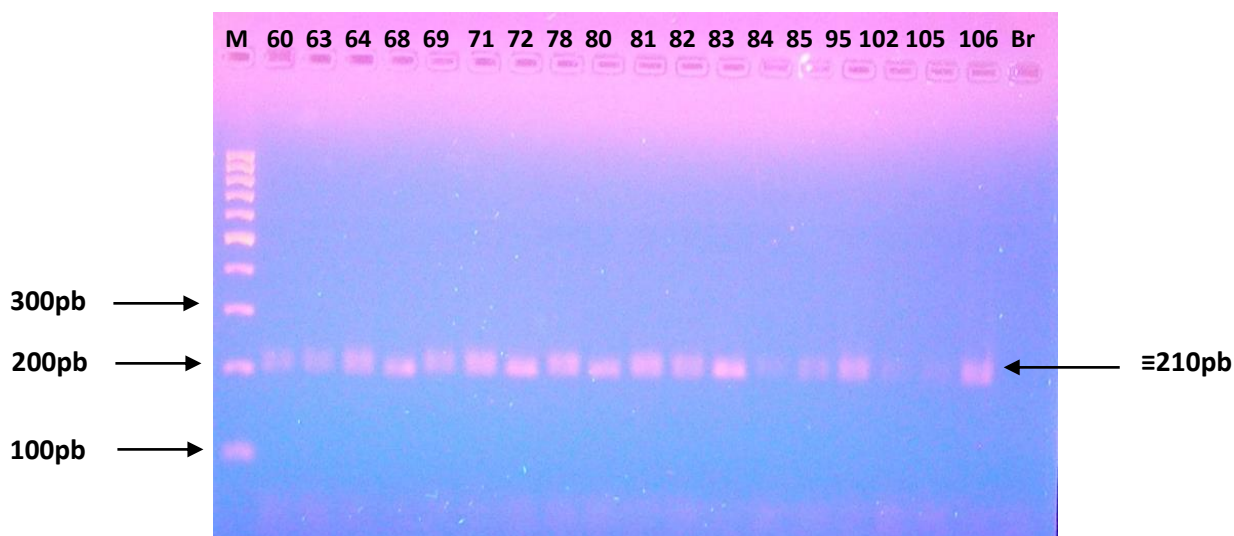
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a detecção molecular de *Neisseria gonorrhoeae*, foram utilizadas 164 amostras cervicais de mulheres com citologia normal/inflamatória, que fizeram parte do projeto “Co-infecção do Papilomavírus Humano e *Chlamydia trachomatis* em mulheres com citologia normal e alterada” (2010), realizado pela pesquisadora Évelyn Costa Lira.

O perfil socioeconômico desse grupo de mulheres demonstrou uma média de idade de 36 anos. É válido ressaltar que houve uma concentração de 55,49% (91/164) de mulheres na faixa etária de 21-40 anos. Entre essas mulheres, 55,48% (91/164) eram casadas ou possuíam união estável, 49,39% (81/164) completaram o ensino médio e 44,51% (73/164) recebiam até 1 salário mínimo por mês. Além disso, a média de idade da primeira relação sexual foi de 17 anos e a da primeira gestação foi de 21 anos, 50% (82/164) dessas mulheres faziam uso de algum tipo de anticoncepcional, 62,80% (103/164) não eram tabagistas e 40,85% (67/164) tiveram cinco ou mais parceiros sexuais.

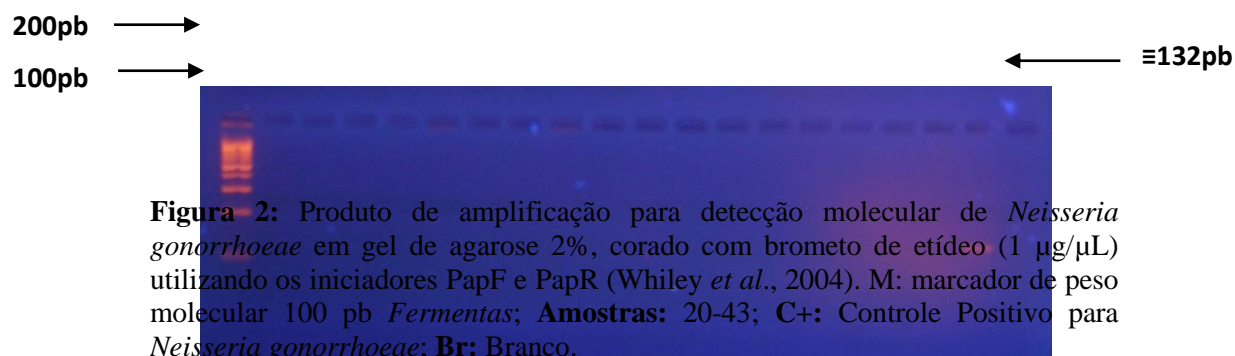
As amostras que compuseram este grupo de estudo foram coletadas em uma Policlínica que fica localizada na zona centro-sul de Manaus, considerada uma região de classe média. Esta Policlínica é apontada como modelo de sistema ambulatorial e acessibilidade e oferecer atendimento diferenciado ao disponibilizar serviços médicos especializados nas áreas de Pneumologia, Cardiologia, Ginecologia, Otorrinolaringologia, Urologia, Dermatologia e Gastroenterologia, além de serviços como ultrassonografia, fisioterapia, nutrição, vacinação, psicologia e curativos aos 500 usuários que recebe por dia, o que muitas vezes, não acontece nas demais regiões, bem como nos demais municípios do Amazonas (SEMSA, 2014).

Todas as amostras foram positivas na PCR para a detecção do DNA genômico humano, o que tornou possível a confirmação da viabilidade das amostras e a continuidade do estudo (FIGURA 1).



**Figura 1:** Produto de amplificação do DNA genômico em gel de agarose a 2,5%, corado com brometo de etídeo (1 $\mu$ g/ $\mu$ L), utilizando os iniciadores ISSO 5G (PONTES, 2002). **M:** marcador de peso molecular 100 pb *Fermentas*; **Amostras:** 60-106; **Br:** Branco.

As amostras foram padronizadas em concentração de 10-20 ng/ $\mu$ L e submetidas à detecção molecular de *Neisseria gonorrhoeae*, através da PCR convencional, utilizando-se como controle positivo uma amostra de cultura de *Neisseria gonorrhoeae*, cedida pelo Alfredo da Matta, como mostrado na FIGURA 2.



**Figura 2:** Produto de amplificação para detecção molecular de *Neisseria gonorrhoeae* em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) utilizando os iniciadores PapF e PapR (Whiley *et al.*, 2004). M: marcador de peso molecular 100 pb *Fermentas*; **Amostras:** 20-43; **C+:** Controle Positivo para *Neisseria gonorrhoeae*; **Br:** Branco.

As 164 amostras apresentaram resultado negativo para o DNA de *Neisseria gonorrhoeae*.

No estudo realizado em Coari, em 2010, com mulheres atendidas pela Rede Básica de Saúde, foi encontrada uma prevalência de 1,4% (5/361) para este mesmo patógeno (ROCHA, 2012).

Codes *et al.* (2006) encontraram uma prevalência de 0,5% (1/202) da infecção por *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres que realizam o exame ginecológico rotineiramente, na cidade de São Paulo.

O Ministério da Saúde encontrou uma prevalência de 1,5% (14/2913), de mulheres infectadas pela *Neisseria gonorrhoeae*, na cidade do Rio de Janeiro, ao desenvolver um estudo multicêntrico nacional (BRASIL, 2008).

A negatividade para o patógeno em questão assemelha-se apenas à encontrada em um estudo realizado em São Paulo, cuja amostra era composta de mulheres inférteis (PANTOJA *et al.*, 2012).

Os principais fatores de risco apontados para a infecção por *Neisseria gonorrhoeae* são o início precoce de atividade sexual, o número de parceiros sexuais e a baixa adesão ao uso de preservativo. Sua prevalência também pode variar de acordo com o gênero, presença de sintomas, área geográfica e o teste empregado para o diagnóstico, o que dificulta sua detecção real (BIGNELL *et al.*, 2006; PIAZZETTA *et al.*, 2011).

Testes de amplificação dos ácidos nucleicos para *Neisseria gonorrhoeae* estão disponíveis desde a década de 1990. Vários ensaios já foram desenhados desde então, no entanto, sempre foram considerados problemáticos quanto à falso-positivos, bem como à falso-negativos (FREDLUND *et al.*, 2004).

Apesar do ensaio diagnóstico utilizado neste estudo ser uma adaptação para PCR convencional, ele foi testado e mostrou-se efetivo como pode ser observado no estudo da pesquisadora Rocha (2012) e também neste estudo quando considerado que obtivemos positividade para as amostras conhecidamente positivas para *Neisseria gonorrhoeae*.

Entretanto, os próprios autores ressaltam ser o diagnóstico molecular desta bactéria, por meio da amplificação dos ácidos nucleicos, um desafio contínuo (WHILEY, TAPSOLL, SLOOTS, 2006).

A quantidade de participantes desse estudo pode ser apontada como um fator de impedimento para o resultado negativo deste patógeno, quando comparada aos demais estudos realizados. Além disso, por se tratarem de amostras pertencentes a outra pesquisa e, portanto, já coletadas, fomos impossibilitados de realizar a cultura bacteriana, considerada padrão-ouro na detecção da *Neisseria gonorrhoeae*, e assim, comparar os resultados encontrados pelo diagnóstico molecular.

Apesar dos resultados negativos, pôde-se aprender e aprimorar o método da PCR que pode ser aplicado nos mais diversos tipos de pesquisas.



## 6. CONCLUSÕES

As pacientes analisadas, com citologia normal/inflamatórias submetidas ao diagnóstico molecular, não apresentaram infecção por *Neisseria gonorrhoeae*.

Ao observarmos as características sócio-demográficas concernentes às pacientes analisadas demonstram um fator de exposição relevante a partir dos dados observados como o da primeira relação sexual, número de parceiros, etc e facilitação à infecção por uma DST aumentado, no entanto, não foi possível relacioná-las à infecção pela *Neisseria gonorrhoeae*.

Como obtivemos um resultado negativo da PCR utilizando como alvo o gene *por A* seria necessário a realização de um estudo comparativo analisando diferentes alvos no DNA da *Neisseria gonorrhoeae* para verificar a eficácia da PCR para o diagnóstico desta bactéria.

Neste estudo não foi possível realizar a cultura para o diagnóstico da *Neisseria gonorrhoeae*, pois as amostras já haviam sido coletadas em trabalho anterior como citado anteriormante, fato este que dificultou a avaliação dos dados obtidos.

Consideramos extremamente válida a experiência de pesquisa já que aprendemos um método diagnóstico de extrema relevância e que pode ser utilizado em pesquisa de diversos patógenos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRETO, N.A.; SANT'ANNA, R.R.P.; SILVA, L.B.G. **Caracterização fenotípica e molecular de *Neisseria Gonorrhoeae* isoladas no Rio de Janeiro, 2002-2003.** DST- J bras Doenças Sex Transm, v.16, n.2, p.32-42, 2004.

BENZAKEN, A. S; SALES, D. N; JUNIOR, J. IL P.; PEDROSA, V. L; GARCÍA, E. G. **Prevalência da Infecção por Clamídia e Gonococo em Mulheres Atendidas na Clínica de DST da Fundação Alfredo da Matta,** Manaus, Amazonas, 2010.

BIGNELL, C.; ISON, A.; JUNGSMANN, E. **Gonorrhoea.** Sex Transm Infect, v.82, n.IV, p.iv6-iv9, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. **Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005.** Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

CODES , J.S.; COHEN, D.A.; MELO, N.A. et al. **Detecção de doenças sexualmente transmissíveis em ambientes clínicos e não clínicos na cidade de Salvador, Bahia, Brasil.** Cad. Saúde Pública, v.22, n.2, p.325-334, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J.L. **Isolation of plant DNA from fresh tissue.** Focus,v.1,p.13-15, 1991

FERREIRA, W.A.; VASCONCELOS, W.S.; SILVA, M.F.P. **Resistência da *Neisseria gonorrhoeae* a antimicrobianos em Manaus: período de 2005-2006.** DST – J bras Doenças Sex Transm, v.19, n.2, p.65-69, 2007.

FREDLUND, H.; FALK, L.; JURSTRAN, M.; UNEMO, M. **Molecular genetic methods for diagnosis and characterization of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions.** APMIS, v.112, p.771-784, 2004.

HABERER, G.; FISCHER, T. C.; TORRES-RUIZ, R. A. **Mapping of the Nucleolus Organizer Region on Chromosome 4 in *Arabidopsis thaliana*.** Molecular and General Genetics, v. 250, n.1, p.123-128, 1996.

HECKELS, J. E.; **Molecular studies on the pathogenesis of Gonorrhoea.** Microbiology Department, University of Southampton Medical School, Southampton General Hospital, Southampton SO9 4XY

MINISTÉRIO DA SAÚDE. BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. **Prevalência e frequências de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras, 2005.** Brasília: Ministério da Saúde, 224p, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. PROGRAMA NACIONAL DE DST E AIDS. **Manual de controle das Doenças Sexualmente transmissíveis. Coleção DST/AIDS, Série**

Manuais 68; 4ª Ed. 2006; Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_controle\\_das\\_dst.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_controle_das_dst.pdf)> Acesso em: 08/02/2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS. **DST no Brasil**; Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/dst-no-brasil>>. Acesso em: 29 Jan 2014.

MURRAY, M.; THOMPSON, W. F. **Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA**. Nucleic acid research, v.8, p.4321-4325, 1980.

PANTOJA, M.; CAMPOS, E.A.; PITTA, D.R.; GABIATTI, J.E.; BAHAMONDES, M.V.; FERNANDES, A.M.S. **Prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* em mulheres candidatas à fertilização *in vitro* em serviço público de referência do Estado de São Paulo**. Rev Bras Ginecol Obstet, v.34, n.9, p. 425-431, 2012.

PENNA, G. O.; HAJJAR, L. A.; BRAZ, T. M.; **Gonorréia**. Rev Soc Bras Med Trop, v.33, n.5, p.451-464, 2000.

PIAZZETTA, R.C.P.S.; CARVALHO, N.S.C.; ANDRADE, R.P.; PIAZZETTA, G.; PIAZZETTA, S.R.; CARNEIRO, R. **Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* em mulheres jovens sexualmente ativas em uma cidade do sul do Brasil**. RBGO, v.33, n.11, p.328-333, 2011.

PONTES, I.M. **Desenvolvimento de novos marcadores microssatélites para análise genética em humanos**. São Carlos: UFSCar, 2002. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

ROCHA, D. A. P.; **Epidemiologia Molecular de Patógenos Sexualmente Transmissíveis em Mulheres no Município de Coari, Amazonas**. Universidade Federal do Amazonas, TESE (Doutorado em biotecnologia, área de concentração em Saúde) - colegiado do Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, 2012.

RODRIGUES, J.J.S.; SILVA, R.C.; SIQUEIRA, M.M. **Técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao diagnóstico**. In: ROSSETTI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S. Doenças infecciosas – Diagnóstico Molecular - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 16-40, 2006.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning; a laboratory manual**, 2ª Edição. New York: Cold Spring Harbor Lab. USA, 1989

SCHIELKE, S.; FROSCH, M.; KURZAI, O. **Virulence determinants involved in differential host niche adaptation of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae***. Med Microbiol immunol, v.199, p.185-196, 2010.

THAYER JD, MARTIN JR JE. **Improved medium selective for the cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis***. 1966.

WATSON, J.D.; MYERS, R.M.; CAUDY, A.A.; WITKOWSKI, J.A. **DNA recombinante: genes e genomas**. 3ª Edição, 496p., Porto Alegre: Artmed, 2009.

WHILEY, D.M.; BUDA, P.J.; BAYLISS, J.; COVER, L.; BATES, J.; SLOOTS, T.P. **A new confirmatory *Neisseria gonorrhoeae* real-time PCR assay targeting the porA pseudo-gene**. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, v.23, p. 705-710, 2004.

WHILEY, D.M.; TAPSALL, J.W.; SLOOTS, T.P. Nucleic acid amplification testing for *Neisseria gonorrhoeae*. An ongoing challenge. **J Mol Diagnos**, v.8, p.3-15, 2006.