

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
CURSO DE MESTRADO ACADEMICO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR APLICADA A SAÚDE



Avaliação da coinfecção de *Chlamydia trachomatis* e do
Papilomavírus Humano em mulheres portadoras do Vírus da
Imunodeficiência Humana

Vera Mileide Trivellato Grassi

Canoas

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
CURSO DE MESTRADO ACADEMICO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR APLICADA A SAÚDE



Avaliação da coinfecção da *Chlamydia trachomatis* e do
Papilomavírus Humano em mulheres portadoras do Vírus da
Imunodeficiência Humana (HIV)

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular
Aplicada a Saúde como requisito
para obtenção do título de mestre

Vera Mileide Trivellato Grassi

Orientadora: Dra. Márcia Susana Nunes Silva

Canoas

“Conhecimento não é aquilo
que você sabe, mas o que você
faz com aquilo que você sabe.” –

Aldous Huxley

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus, Pai
Eterno, que sempre nos coloca no caminho
certo, pois tudo já estava escrito;

Aos meus Pais, Otávio e Zinha, pelo Amor, apoio,
incentivo e compreensão;

Aos meus irmãos, Liliane, Gislaine e Luís Otávio,
amigos e companheiros desta vida, que sempre
torceram por mim;

E a todos que me apoiaram direta ou
indiretamente a realizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, pois sem ele nada seria possível.

A todos do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada a Saúde, e a todos os professores pelos seus ensinamentos.

A todos do Hospital Regional de Cáceres, em especial aos meus amigos do Laboratório, e aos amigos da Farmácia Popular do Brasil de Cáceres, pelos incentivos e compreensão a minha ausência durante este período.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular, Alana, Allison, Fernanda, Francielle, Graziela, Mirella e Tanise, por me receberem de braços abertos e pela ajuda e colaboração neste projeto.

A Dra. Maria Lucia, pois foi a primeira a acreditar que eu poderia realizar este trabalho.

A minha querida orientadora Dra. Marcia Susana, por todos os ensinamentos, pelo apoio, orientação, dedicação e amizade.

Ao Amplicon Laboratório de Biologia Molecular por ter disponibilizado algumas amostras para a realização dos testes moleculares.

A todos que de alguma forma me ajudaram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus irmãos, Luis Otavio, Gislaíne e Líliane, pelo incentivo, paciência e compreensão nesta minha jornada.

E pôr fim aos meus amados pais, Otávio e Zinha, por todo o Amor, incentivo, apoio e dedicação, por serem tão especiais pois sem eles eu não conseguiria ter forças para ficar tanto tempo longe de casa, da família e vir me aventurar neste projeto para realizar este antigo sonho.

A todos muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1.INTRODUÇÃO.....	12
2.REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 A <i>Chlamydia trachomatis</i>	15
2.1.1 Agente Etiológico.....	15
2.1.2 A Doença.....	16
2.1.3 Métodos de Diagnóstico.....	17
2.2 Papiloma Vírus Humano	19
2.2.1 Agente Etiológico.....	19
2.2.2 A Doença.....	20
2.2.3 Métodos de Diagnóstico.....	21
2.3 Vírus da Imunodeficiência Humana.....	22
2.3.1 Agente Etiológico.....	22
2.3.2 A Doença.....	23
2.3.3 Métodos de Diagnóstico.....	24
2.4 Técnicas moleculares mais utilizadas para o diagnóstico de doenças.....	26
2.5 Coinfecção <i>C. trachomatis</i> , HPV e HIV.....	29
3. OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
4. METODOLOGIA.....	32
4.1 População de Estudo.....	32
4.2 Dados Clínicos.....	32
4.3 Critérios de inclusão.....	32
4.4 Critérios de exclusão.....	33
4.5 Testes Moleculares.....	33
4.5.1 Extração do DNA.....	33
4.5.2 Detecção do DNA da <i>C. trachomatis</i> por PCR.....	33
4.5.3 Detecção e Genotipagem do HPV.....	34
4.6 Análises Estatísticas.....	34
4.7 Aspectos Éticos.....	35
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÃO.....	48
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	50

Lista de Abreviaturas:

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

C.trachomatis: *Chlamydia trachomatis*

CDC: Centro de Controle de Doenças

CDCT: Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

cDNA: DNA complementar

CEP: Comitê de Ética

CTA: Centro de Testagem e Aconselhamento

DAS: Departamento de Ações de Saúde

DBS: Dried blood spots

DIP: Doença inflamatória pélvica

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPP: Plataforma de Migração dupla

DST: Doença Sexualmente Transmissível

EB: Corpúsculo Elementar

EIA: Enzima Imunoensaio

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoabsorção enzimática

ES: Espírito Santo

EUA: Estados Unidos da América

FC: Fixação de Complemento

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV: Papilomavírus humano

HSH: Homens que fazem Sexo com Homens

HSV: Herpes vírus

IB: Immunoblot

IBR: Immunoblot rápido

IC: Intervalo de Confiança

IE: Imunoensaio

IFI: Imunofluorescência Indireta

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

ISTs: Infecções Sexualmente Transmissíveis

LIA: Line Immuno Assay

LPS: Lipopolissacarídeo

MCO: Microscopia de Campo Escuro

MIF: Micro imunofluorescência

MONP: Proteína de membrana majoritária

M-PCR: PCR Multiplex

MS: Ministério da Saúde

nPCR: Nested PCR

OMS: Organização das Nações Unidas

pb: Pares de base

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

RNA: Acido ribonucleico

rRNA: Ácido ribonucleico ribossômico

RS: Rio Grande do Sul

RT-PCR: Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction

SPSS: Statistical Package for Social Science

TEB1x: Tris-borate-EDTA 1x

TM: Testes Moleculares

TR: Testes Rápidos

UV: Luz Ultravioleta

VDRL: Veneral Disease Research Laboratory

WB: Western Blot

RESUMO:

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) são causadas por mais de 30 patógenos diferentes e estima-se que possam infectar 500 milhões de pessoas ao ano. Nas mulheres os sintomas das ISTs podem ser confundidos com reações comuns do organismo, e por isso, a atenção deve ser redobrada. A clamídia é uma das ISTs mais comuns, e quando não tratada, pode causar dor durante a relação sexual e até infertilidade. Em 2014, o Centro de Controle de Doenças Americano (CDC) registrou 2,8% de aumento do número de casos de clamídia. No Brasil, estima-se aproximadamente 2 milhões de novos casos por ano, embora a clamídia não seja de notificação obrigatória, tornando difícil obter estatísticas gerais fidedignas. O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência da *Chlamydia trachomatis* a associação de fatores sociodemográficos e clínicos com a infecção e analisar se a presença do Papilomavírus Humano (HPV) pode influenciar para a aquisição desta infecção em mulheres infectadas com HIV/AIDS atendidas em um centro de testagem e aconselhamento/serviço de assistência especializada CTA/SAE de Caxias no estado do Maranhão. Este estudo usou como método de diagnóstico a reação em cadeia de polimerase (PCR). Foi encontrada uma prevalência de 16,8% de *C. trachomatis* na população estudada com associação estatística significativa apenas nas mulheres com idade superior a 25 anos. A presença do HPV não foi correlacionada como sendo um fator de risco, mas foi detectado em 44,8% das mulheres estudadas e destas, 10,8% estavam coinfectadas. Os genótipos 16 e 18 do HPV foram encontrados em 100,0% onde foram detectadas as coinfeções. Os resultados encontrados ilustram a importância do diagnóstico e da prevenção as ISTs para diminuir as complicações causadas e visando a prevenção do HIV.

Palavras-chave: ISTs, *C. trachomatis*, HPV, HIV.

ABSTRACT:

Sexually Transmitted Infections (STIs) are caused by more than 30 different pathogens and are estimated to infect 500 million people a year. In women, the symptoms of STIs may be confused with common reactions of the body, and therefore, the attention should be redoubled. Chlamydia is one of the most common STIs, and when left untreated, it can cause pain during intercourse and even infertility. In 2014, the US Centers for Disease Control (CDC) reported a 2.8% increase in the number of chlamydia cases. In Brazil, approximately 2 million new cases are estimated per year, although chlamydia is not mandatory reporting, making it difficult to obtain reliable general statistics. The objective of this study was to verify the prevalence of *Chlamydia trachomatis* in the association of sociodemographic and clinical factors with the infection and to analyze whether the presence of Human Papillomavirus (HPV) could influence the acquisition of this infection in HIV / AIDS infected women treated at a center CTA / SAE de Caxias in the state of Maranhão. This study used the polymerase chain reaction (PCR) as a diagnostic method. A prevalence of 16.8% of *C. trachomatis* was found in the studied population with a statistically significant association only in women older than 25 years. The presence of HPV was not correlated as a risk factor but was detected in 44.8% of the women studied and of these, 10.8% were coinfecting. Genotypes 16 and 18 of HPV were found in 100.0% where the coinfections were detected. The results found to illustrate the importance of diagnosis and prevention of STIs in order to reduce complications and to prevent HIV.

Keywords: ISTs, *C. trachomatis*, HPV, HIV.

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) causam diversas patologias, desde as mais brandas até as mais graves, podendo chegar à infertilidade, complicações na gravidez e até transmissão de infecções da mãe para o feto. Entre esses patógenos estão o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), o Papilomavírus humano (HPV) e a *Chlamydia trachomatis* (Vega et al., 2016; Brasil, 2013).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou para 2004, 340 milhões o número de casos de ISTs considerada curáveis (sífilis, gonorreia, clamídia e tricomoniase). Conforme os dados do relatório global publicado em 2012 para essas ISTs, foram estimados 498,9 milhões de novos casos no ano de 2008, sendo que para *C. trachomatis* a estimativa ficou em 105,7 milhões (Avelleira et al., 2006; Saude, 2013). Nos últimos anos ocorreu um aumento das ISTs, onde foi mostrado que as mulheres são mais acometidas que os homens e que o aumento também está em grupos com comportamento de risco, como homens que fazem sexo com homens (HSH) e nas profissionais do sexo (Avelleira et al., 2006; Garcia et al., 2011; Piazzetta et al., 2011).

A *C. trachomatis* é considerada uma das principais causadoras de infertilidade, além de causar gravidez ectópica, uretrites, salpingites, cervicites, endometriose e doença inflamatória pélvica (DIP). No caso do HPV, este é considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino, com maior chance de desenvolvimento em mulheres portadoras do HIV em decorrência da imunossupressão (Proto et al., 2014). O interesse de estudos para diagnóstico e tratamento para essas ISTs, não está somente no fato desses patógenos causarem problemas como a doença pélvica ou infertilidade, mas principalmente pela possibilidade de evitar um aumento na transmissão do vírus HIV (Piazzetta et al., 2011).

O alto risco para a infecção persistente pelo HPV e neoplasia cervical em mulheres HIV-positiva parece decorrer da interação entre os dois vírus, determinando a diminuição da imunidade local por redução das células de Langerhans e da produção de citocinas (Sun, et al., 1997; Vaz, 2009). A infecção

pelo HIV pode levar ao aumento da oncogenicidade tanto do HPV de alto risco como nos de baixo risco. Entretanto, não está totalmente claro se as infecções por tipos de HPV, que raramente progridem para lesões severas em mulheres imunocompetentes, possam causar lesões de alto grau e câncer invasivo em mulheres HIV positivo (Tornesello et al., 2008; Wohlmeister et al., 2016).

As ISTs rompem a barreira epitelial e geram processos inflamatórios que aumentam a infecciosidade do HIV nos indivíduos infectados por este vírus, sendo que as coinfeções genitais aumentam os níveis destes nas secreções genitais, aumentando assim a transmissão sexual secundária (Kaul et al., 2008; Kinsseger et al., 2009).

A OMS estima que a cada ano ocorram em torno de 92 milhões de novos casos de *C. trachomatis*, dos quais a maioria é observada em países em desenvolvimento, afetando principalmente adolescentes e jovens (Piazzetta et al., 2011). No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 1.967.200 novos casos de *C. trachomatis*, embora esta não se inclua entre as ISTs de notificação compulsória. Comparada com outras ISTs, as infecções por *C. trachomatis* são as mais frequentes, com 384.555 casos nos países da União Europeia no ano de 2013 (Koksal et al., 2016).

Estudos epidemiológicos sobre a infecção por *C. trachomatis* têm documentado uma prevalência substancial do organismo em mulheres jovens e sexualmente ativas que variam de 1 a 38%. No entanto, a comparação das medidas de prevalência entre diferentes regiões do mundo é difícil devido aos diversos testes diagnósticos utilizados e às amostras populacionais não comparáveis. No Brasil, estudos com diferentes populações aplicando diferentes metodologias têm mostrado uma alta prevalência da *C. trachomatis* em adolescentes grávidas (9,8%) e mulheres jovens sexualmente ativas de 16 a 23 anos (10,7%) (Pinto et al., 2011; Piazzetta et al., 2011).

Um estudo que envolveu seis capitais brasileiras em 2005 encontrou uma prevalência média de 9,4% para a *C. trachomatis*, valores semelhantes a outros estudos nacionais realizados com amostras de gestantes ou mulheres jovens sexualmente ativas atendidas em clínicas de DST (Piazzetta et al., 2011; Neves, et al., 2016). Alguns estudos mostraram que a prevalência da *C. trachomatis* em

mulheres jovens HIV positiva é de 2% a 10%. No Brasil, um estudo realizado no Rio de Janeiro encontrou 3% de prevalência para a *C. trachomatis*. Já em outro realizado em Manaus, a prevalência encontrada foi de 3,4%, além de obterem com os dados encontrados que a infecção por *C. trachomatis* foi um fator de risco para a infecção em pacientes HIV positivos, com idade de até 29 anos que fazem uso de drogas ilícitas apresentavam dor pélvica (Scheer et al., 2006; Grinsztejn et al., 2006; Silva et al., 2012).

Com relação ao HPV, esta é considerada a IST mais frequente em todo o mundo, cuja prevalência varia entre 2% a 68%, conforme relatos publicados na literatura (Vaz, 2009). Estima-se que, 75% da população sexualmente ativa entrem em contato com um ou mais tipos de HPV durante sua vida, sendo que a metade dos novos casos acontece nos primeiros anos de atividade sexual (Vaz, 2009).

As infecções pelo HPV são usualmente transientes e não necessariamente levam a lesões clinicamente significativas da mucosa cervical. Entretanto, dados epidemiológicos e laboratoriais sustentam a conclusão de que o HPV é o agente etiológico mais importante das lesões epiteliais pré-malignas e malignas da mucosa cervical, sendo o DNA do HPV detectado em 95% a 100% de todos os casos (Francesco et al., 2005). Outros estudos mostraram que os fatores como o fumo, o uso de contraceptivo oral e a presença de outras infecções sexuais provavelmente estão envolvidos na transformação maligna da mucosa cervical (Vaz, 2009; Piazzetta et al., 2011).

O HPV e a *C. trachomatis* quando não tratados, aumentam significativamente o risco de contração da infecção pelo HIV devido à entrada do vírus ser facilitada pela presença das lesões, pelas endocervicites nas mulheres e pelas uretrites nos homens, que tiram as barreiras naturais que protegeriam o organismo contra o HIV. A presença do HPV e da *C. trachomatis* no organismo acelera a evolução da infecção pelo HIV para a AIDS (Granato, 2013; Brasil, 2016).

2.REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A *Chlamydia trachomatis*

2.1.1 Agente Etiológico

A *C. trachomatis* é uma bactéria patogênica, com parede celular semelhante à das bactérias gram-negativas, não móvel e parasita intracelular obrigatória. É um parasita exclusivamente humano e apresenta tropismo pelas células conjuntivais e urogenitais (Somani et al., 2010; Silva, 2014).

O ciclo de desenvolvimento da *C. trachomatis* difere muito de outros microrganismos e serve de base para a sua classificação taxonômica. Inicialmente o corpúsculo elementar (EB), que é uma partícula infecciosa, mas metabolicamente inativa que penetra na célula em um endossoma, onde o desenvolvimento é realizado. Na infecção estão envolvidos mecanismos de resposta imune específicos, inespecíficos, celular e humoral (Silva, 2014).

Primeiramente, a *C. trachomatis* foi classificada em uma única ordem, Chlamydiales, família Chlamydiaceae, dentro de um único gênero, *Chlamydia*, com 4 espécies reconhecidas tais como: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia pecorum*. Posteriormente, após uma análise da sequência do rRNA 16s e 22s, a classificação taxonômica foi refeita e a ordem Chlamydiales foi dividida em 4 famílias: Primeira: Chlamydiaceae, contendo dois gêneros, *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. muridarum* e *C. suis*) e *Chlamydophila* que inclui a (*C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. abortus*, *C. caviae* e *C. felis*); Segunda: Simkaniaceae que inclui *Simkania negevensis*; Terceira: Parachlamydiaceae que inclui *Parachlamydia acanthamoeba*; Quarta: Waddliaceae que inclui *Waddlia chondrophila* (Igansi, 2005).

A *C. trachomatis* possui antígenos comuns e antígenos espécie-específicos. O antígeno majoritário comum é denominado lipopolissacarídeo (LPS) e a proteína de membrana majoritária (MOMP) apresenta heterogeneidade antigênica, permitindo a sua sorotipagem (Becker, 2005).

A *C. trachomatis* tem 19 sorotipos que são classificados baseados na variação antigênica da MOMP. Os sorotipos A, B, Ba e C causam infecção

conjuntiva e doença ocular, que podem levar a cegueira. Os sorotipos D, Da, E, F, G, Ga, H, I, Ia, J, K, que são os responsáveis pela uretrite não gonocócica, epididimite, cervicites, uretrites, endometrite, salpingites e Peri-hepatite. A *C. trachomatis* pode ser transmitida da mãe para o filho, causando normalmente pneumonias e também outras infecções (Tabela 1). Os sorotipos L1, L2 e L3 causam linfogranuloma venéreo (Koksal et al., 2016; Bianchi et al., 2016).

Tabela 1. Síndromes humanas causadas pela *Chlamydia trachomatis*.

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

Adaptado de Becker, 2005

O genoma da *C. trachomatis* é formado por um único cromossomo circular com 1.042.519pb que codifica para aproximadamente 875 proteínas, algumas exclusivas da espécie e um plasmídeo com 7493pb (Valladão et al., 2011; Koksal et al., 2016).

2.1.2. A Doença

A *C. trachomatis* causa em sua grande maioria uretrites e cervicites, podendo ainda evoluir para sequelas pélvicas, doenças pélvicas, gestação ectópica e até a infertilidade. É o segundo microrganismo mais encontrado na endocérvice, juntamente com a *Neisseria gonorrhoea*. Aproximadamente 20% das mulheres com alto grau de infecção podem desenvolver inflamações, 4% doença pélvica crônica, 3% infertilidade e 2% gravidez ectópica (Silveira et al., 2017). É considerada uma das ISTs mais comum e normalmente é assintomática, o que aumenta o risco de contaminação entre parceiros (Bianchi et al., 2016).

Os sintomas quando ocorrem são em sua grande maioria, corrimento vaginal e disúria. Quando chega a ocorrer à doença inflamatória pélvica (DIP), os sintomas podem ser ausentes ou súbitos, como dor uterina ou pélvica. Os sintomas clínicos são cervicites mucopurulentas, friabilidade cervical, piúria (Proto et al., 2014).

Em gestantes aumenta o risco de natimortos e de morte neonatal, e também pode causar DIP no pós-parto. Também é a causa mais comum de conjuntivite neonatal e pneumonia na primeira infância (Rossetti et al., 2006).

No homem ela causa uretrites e mais raramente epididimite cujos sintomas quando ocorrem, são corrimento uretral e piúria, diferentes dos encontrados na gonorréia (Rossetti et al., 2006; Proto et al., 2014).

O tratamento é realizado com diversos antibióticos, tais como a tetraciclina, fluroquinolonas, rifampicina, eritromicina, entre outras, sendo que a mais utilizada é a azitromicina, com chances de recorrência de 5 a 13% (<https://www.mdsaude.com/2012/07/clamidia.html>, pagina acessada em 15/08/17; 1, pagina acessada em 16/08/17). O uso de microbicidas vaginais e preservativos são indicados para a prevenção da doença (Passos, 2003).

2.1.3. Métodos de Diagnóstico

A *C. trachomatis* pode ser diagnosticada de forma direta ou indireta. Independentemente do método, o tipo de amostra e como ela foi coletada é essencial para a sensibilidade e especificidade do diagnóstico (Seadi et al., 2002).

a. Métodos Diretos

O exame citológico direto com coloração por Giensa é muito útil nos casos de conjuntivite em recém-nascidos, mas não é tão sensível nos casos de adultos, e o exame mais utilizado é a cultura que pode ser feita de swab endocervical e uretral. A cultura é realizada pela inoculação do espécime em monocamadas de cultura celular, entretanto esse procedimento demora em torno de 3 a 7 dias. Além disso, envolve a utilização de linhagens celulares específicas e depois

visualização por imunofluorescência ou coloração por Giemsa ou iodo, para posteriormente ser realizada a sorotipagem dos isolados com anticorpos monoclonais (Seadi et al., 2002; Andrade et al., 2014).

b. Métodos Indiretos e Sorológicos

A pesquisa de anticorpos específicos é feita por fixação de complemento (FC), imunofluorescência indireta (IFI), que utilizam células infectadas com o sorotipo L2 e também a enzima imunoensaio (EIA) que utiliza antígenos recombinantes e detecta anticorpos gênero-específico, ou seja, contra LPS presentes nos corpos elementares ou reticulares. A técnica de micro imunofluorescência (MIF) detecta anticorpos de espécie e subespécie específica (Seadi et al., 2002; Andrade, et al., 2014).

Todas essas técnicas permitem detectar todas as classes de imunoglobulinas de classe IgG, IgA e IgM, individualmente ou por classe. Sendo que a IgM é mais frequente quando a infecção é recorrente (Seadi et al., 2002; Andrade et al., 2014).

Os testes com anticorpos parecem não ser os mais adequados, pois as infecções superficiais não são boas estimulantes para a formação de anticorpos. Os anticorpos IgG persistem durante anos mesmo após o tratamento com o antibiótico. Por outro lado, os testes com IgM não têm significado no diagnóstico de doença ativa ou anterior (Andrade, et al., 2014; Proto, et al., 2014).

A disponibilidade do uso dos testes rápidos como a imunocromatografia, que apesar de terem menor especificidade e sensibilidade que os moleculares, ficam prontos em 5 minutos, o que facilita o tratamento do paciente, que não irá precisar de uma nova consulta para ter o diagnóstico (Meyer, 2016).

c. Métodos Moleculares

A pesquisa de ácidos nucleicos passou a ser usada a partir de 1980 por ser mais sensível e específica. Inicialmente, a pesquisa era realizada com a utilização de sondas de DNA que hibridizam com uma sequência específica do gene que codifica o rRNA 16s da *C. trachomatis*. Atualmente, o exame mais utilizado é o

PCR e as suas variações, como o PCR em tempo real ou PCR multiplex (Silva, 2014; Koksai, et al., 2016).

2.2. HPV

2.2.1. Agente Etiológico

O papilomavírus humano (HPV) pertence à família Papillomaviridae. Apresenta um genoma de DNA circular, dupla fita com aproximadamente 7900pb, contendo poucos genes e todos codificados na mesma cadeia. A forma do capsídeo é icosaédrica com 50 a 60 nanômetros e não é revestida por envelope lipídico (Burd, 2003).

O genoma tem duas regiões, a reguladora e a codificadora. A região reguladora (*long control region*) contém a origem da replicação viral e a maioria dos genes promotores da transcrição. A região codificadora (*open reading frame*) é dividida em sequências precoce e tardia. Na precoce (Early) ocorre a codificação das proteínas E1, E2, E6, E7 que estão envolvidas na replicação do DNA viral e transformação celular. Na tardia (Late) são codificadas as proteínas do capsídeo L1, L2, responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus (Silva et al., 2014).

O HPV tem tropismo por células epiteliais, assim a infecção começa na camada basal da epiderme, na pele e mucosas, onde o vírus se replica e expressa suas proteínas, mas essa replicação do DNA somente ocorre nas células mais diferenciadas por integração viral (Vaz, 2009; Martins et al., 2013; Silva et al., 2014).

Mais de 120 tipos de HPV já foram identificados e essa diferenciação foi feita com base na heterogeneidade da sequência genômica.

Aproximadamente 40 tipos de HPV infectam especificamente o trato genital e classificam-se em grupos de acordo com seu potencial oncogênico. Os de baixo risco são o HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108; risco intermediário - HPV 34, 57 e 83; de provável alto risco - HPV 26, 53 e 66; e de alto risco, - HPV 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82 (Vaz, 2009; Martins et al., 2013).

2.2.2. A Doença

Os vírus com baixo risco oncogênico, como por exemplo, o HPV 6 e 11, que se apresentam clinicamente como verrugas genitais em cerca de 90% dos casos. Esses vírus também podem infectar os recém-natos no momento do parto e causar papilomatose laríngea, de difícil tratamento e de caráter recidivante (Martins et al., 2013).

Contrariamente, os vírus com alto risco oncogênico, tal como HPV 16 e 18, podem causar neoplasia de baixo e alto grau no trato genital inferior, podendo evoluir para câncer anogenital, em ambos os sexos. A infecção pelo HPV é uma causa necessária na evolução do câncer genital. Ocasionalmente, estes tipos virais são isolados em tecidos e lesões da cavidade oral, orofaringe, laringe e esôfago (Tabela 2) (Vaz, 2009; Silva et al., 2014).

A infecção por HPV é considerada uma condição necessária para desenvolvimento do câncer de colo do útero. Contudo, apesar desta infecção ser a mais comum das ISTs, apenas uma pequena parcela das mulheres infectadas pelo vírus desenvolve o câncer, o que demonstra que apenas a presença do HPV parece ser insuficiente para o desenvolvimento de câncer cervical. No entanto, o surgimento de lesões clínicas depende da persistência da infecção, do tipo de HPV, do sistema imunológico do hospedeiro e de cofatores associados (Martins et al., 2013; Silva et al., 2014).

Sobre os cofatores associados, dependendo do tipo, o desenvolvimento do câncer pode ser de forma rápida ou não. Os cofatores associados na gênese do câncer de colo do útero que se somam à infecção viral são: comportamentais (tabagismo, uso de hormônios exógenos), relacionados ao hospedeiro (idade, resposta imune, predisposição genética) e relacionados ao vírus (tipo, variante, carga viral) (Martins et al., 2013; Silva et al., 2014).

Tabela 2. Associações Clínicas do HPV

Tipo de Lesão	Local	Tipo de HPV
Lesões predominantemente benignas		
Verrugas comuns	Pele (vários locais)	2,4
Verrugas plantares e palmares	Mãos e Pés	1,2,4
Berruga Butcher`s	Mãos	7
Verrugas planas	Pele (vários locais)	3
Verrugas genitais (condiloma acuminata)	Colo do útero	6,11
Papiloma de laringe juvenil	Laringe	6,11
Lesões malignas e potencialmente malignas		
Verrugas planas	Pele	10
Bowenoidpapulosis	Vulva, pênis	16
Pré-malignas e malignas intraepiteliais	Colo do útero, pênis	6,11,16,18,31,36-45,51-56
Neoplasias		
Carcinoma	Colo do útero, pênis	16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68,73,82.
Papiloma/Carcinoma	Laringe	16
Epidermodisplasiaverruciforme	Pele	5,8,9,10,12,14,15,17,19-29

(Tipos de HPV particularmente susceptíveis de se tornarem malignos estão em negrito)

Adaptada de Martins, 2013

2.2.3. Métodos de Diagnóstico

Para a detecção de HPV, a captura híbrida e a PCR são as técnicas mais utilizadas devido a sensibilidade e a especificidade serem elevadas (Martins et al., 2013).

Para a detecção do genoma do HPV utilizando a PCR, existem testes comerciais disponíveis tais como: o teste Amplicor HPV (AMPLICOR® Human Papillomavirus Test) que amplifica um fragmento com 170 pb da região L1 e identifica 13 genótipos de alto risco.

O Linear Array PCR (Linear Array[®] HPV Genotyping Test) que é um sistema de amplificação capaz de identificar 37 genótipos de HPV, todos os de alto e baixo risco na região anogenital humana (Martins et al., 2013; Silva et al., 2014).

Na PCR em Tempo Real, a detecção é através de fluorescência, sendo considerado método preciso para estimar a carga viral por quantificação do teor de um gene nuclear. O teste HPV RNA avalia a atividade viral nas células infectadas (Silva et al., 2014).

2.3. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

2.3.1. Agente Etiológico

A doença causada pelo HIV foi descoberta em 1981 pelo CDC, que descreveu os casos como sendo de infecções oportunistas incomuns e doenças raras em jovens homossexuais do sexo masculino (CDC 1981). O HIV foi isolado em 1983 no Instituto Paster de Parise e, simultaneamente, um grupo de pesquisadores no CDC relatou o isolamento de um vírus linfotrópico de célula T humana. Em 1983-1984 o vírus HIV foi identificado como causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) por Montagner e Gallo. Na época não havia distinção entre uma pessoa soropositiva para HIV e uma com AIDS. Hoje sabe-se que um indivíduo pode ter o vírus e ainda não ter a AIDS (WHO, 2001; WHO, 2012).

O HIV é um vírus de RNA, um retrovírus não oncogênico da família *Retroviridae*, do gênero *Lentivirus* (Case 1986). Apresenta um genoma de aproximadamente 10kb que codifica diversas proteínas. As proteínas do envelope são codificadas pelo gene *env*, as proteínas do core são codificadas pelo gene *gag* e as proteínas com atividade enzimática são codificadas pelo gene *pol*. As proteínas estruturais do HIV são importantes uma vez que é contra elas que se produz a maior parte dos anticorpos detectados pelas técnicas laboratoriais rotineiras. As proteínas com atividade enzimática têm a função de transcriptase reversa, ligase e endonuclease e são responsáveis pela diversidade genotípica do HIV-1. Sua complexidade genômica e sua heterogeneidade explicam sua patogenicidade (Silva et al., 2014).

Em 1986, um novo vírus muito semelhante a este foi descoberto, e assim a AIDS passou a estar relacionada a mais de um tipo de vírus, e o primeiro vírus a ser isolado passou a ter a denominação de HIV-1 e o segundo de HIV-2. Esses dois vírus, apesar de relacionados, tem diferenças expressivas em sua estrutura genômica e na patogenia (Brasil, 2013; Saúde, 2014).

2.3.2. A Doença

A infecção pelo HIV pode ser dividida nos seguintes estágios: infecção aguda, fase assintomática ou latência clínica, fase sintomática inicial, fase sintomática intermediária, fase sintomática tardia e infecção avançada (1, site acessado em 15/02/2008; WHO, 2012; Saúde, 2014).

A classificação pelo CDC de 1993 leva em consideração a apresentação clínica do paciente e a classifica em estágios conforme descrito abaixo:

- A (infecção aguda ou assintomática): Acontece no período de 2 a 4 semanas após a infecção pelo HIV. Nesta fase há uma grande quantidade de vírus no sangue e é muito contagiosa. Mas as pessoas com infecção aguda, muitas vezes não sabem que estão infectadas devido a falta de sintomatologia (WHO, 2012; Saúde, 2014).
- B (sintomática) Fase chamada de latência. Muitas vezes é assintomática e o vírus ainda está ativo, mas reproduz-se em níveis muito baixos. Esta fase pode durar meses ou até anos (WHO, 2012; Saúde, 2014).
- C (sintomática com doença definidora de AIDS): Nesta fase é chamada de AIDS, é o estágio mais grave da infecção pelo HIV. Nesta fase o sistema imunológico fica tão fragilizado que começam a aparecer as chamadas infecções oportunistas (WHO, 2012; Saúde, 2014; Barros et al., 2017).

Quando a pessoa se infecta com o HIV e não é diagnosticada imediatamente, vai passar por todos os estágios da doença. O medicamento para tratar a infecção pelo HIV é a terapia antiretroviral, que pode ser necessária em varias fases da doença, podendo prevenir e deixar mais lenta a evolução de uma fase para outra. Pode reduzir drasticamente as chances de transmissão de HIV para outra pessoa (WHO, 2012; Saúde, 2014).

2.3.3 Métodos de Diagnóstico

Atualmente, os exames para detecção do HIV são divididos em exames de triagem, os confirmatórios e os testes rápidos (Saúde, 2014).

Os exames de triagem são os de imunoensaio, onde o mais usado sempre foi o ELISA, mas atualmente, é a quimiluminescência. Estes ensaios inicialmente só detectavam IgG, com uma janela imunológica de 4 a 8 semanas e não tinham grande sensibilidade. Com o avanço das técnicas para o diagnóstico, essas já estão na quarta geração, onde se faz uma detecção combinada de antígenos e anticorpos das classes IgG e IgM, com uma janela imunológica de 15 dias (Brasil, 2013; Saúde, 2014).

Atualmente, os testes moleculares são os mais eficazes para a confirmação diagnóstica por permitirem o diagnóstico de infecções agudas e/ou recentes, além de apresentarem melhor custo-efetividade (www.drakeilafeitas.com.br/como-fazer-o-diagnostico-do-hiv, pagina acessada em 15/08/17; www.mdsaude.com/2009/01/exame-teste-sorologia-hiv-aids-sida.html, pagina acessada em 15/08/17).

a) Testes Rápidos (TR)

Os testes rápidos (TR) são os imunoensaios (IE) simples que podem ser realizados em até 30 minutos. Como consequência do desenvolvimento e da disponibilidade de TR, o diagnóstico do HIV pode ser realizado em ambientes laboratoriais e não laboratoriais, permitindo ampliar o acesso ao diagnóstico. Existem vários formatos de TR, os mais frequentemente utilizados são: dispositivos (ou tiras) de imunocromatografia de fluxo lateral, imunocromatografia de dupla migração (DPP), dispositivos de imunoconcentração e fase sólida (Brasil, 2013; Saúde, 2014).

b) Ensaios complementares ou confirmatórios.

Embora os testes rápidos (TR) e os imunoensaios (IE) sejam sensíveis e específicos, resultados falso-positivos podem ocorrer, e por essa razão, os testes complementares são necessários para a definição do diagnóstico. Os testes

complementares utilizam diferentes formatos e princípios. Estão incluídos nessa categoria: western blot (WB), imunoblot (IB) ou imunoensaios em linha (LIA, do inglês *Line Immuno Assay*), incluindo o imunoblot rápido (IBR) e imunofluorescência indireta (IFI). A IFI foi muito utilizada como teste complementar durante a primeira década da epidemia de HIV, mas atualmente foi substituída pelo WB e IB. As proteínas relevantes na interpretação do WB e IB para o diagnóstico da infecção pelo HIV-1 são: p24, gp41, gp120 e gp160 (www.drakeilafeitas.com.br/como-fazer-o-diagnostico-do-hiv; Rossetti et al., 2006; Silva et al., 2014).

O IBR é semelhante ao IB, porém utiliza a metodologia de Plataforma de Migração Dupla (DPP). Na fase sólida, estão presentes os antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos dos vírus HIV-1 (p24, gp41, gp120 e gp160), incluindo o grupo O, e também a proteína do HIV-2 (gp36). Ao contrário do WB e IB, o IBR permite a detecção de anticorpos em menos de 30 minutos (Rossetti et al., 2006; Saúde, 2014).

A maioria desses ensaios detectam apenas IgG e por isso não são recomendados para confirmar a presença de anticorpos IgM HIV específicos (ensaios de terceira ou quarta geração) ou a presença do antígeno p24 (ensaios de quarta geração) (www.drakeilafeitas.com.br/como-fazer-o-diagnostico-do-hiv; Brasil, 2013).

c) Diagnóstico por detecção direta do HIV

A infecção pelo HIV pode ser diagnosticada por meio da detecção direta de componentes do vírus, como o antígeno p24 ou com testes moleculares (TM) que detectam RNA ou DNA pró-viral. A detecção do antígeno p24 do HIV-1, de RNA ou DNA desempenha um papel importante quando a detecção de anticorpos não é possível. São especialmente úteis para o diagnóstico em crianças com idade com menos de 18 meses e na infecção aguda em adultos (www.drakeilafeitas.com.br/como-fazer-o-diagnostico-do-hiv; Saúde, 2014). É importante ressaltar que a maioria das pessoas com infecção aguda apresenta carga viral elevada e, conseqüentemente, maior risco de transmitir a infecção aos

seus parceiros (www.mdsaude.com/2009/01/exame-teste-sorologia-hiv-aids-sida.html).

Outra aplicação importante para os TM é o diagnóstico precoce da infecção pelo HIV em crianças com exposição perinatal. Crianças nascidas de mães soropositivas adquirem anticorpos anti-HIV passivamente e, dessa forma, ensaios baseados em anticorpos não podem ser utilizados para confirmar ou descartar a infecção pelo HIV em crianças com idade inferior a 18 meses de idade (Rossetti et al., 2006; Brasil, 2013).

d) Diagnóstico utilizando amostras de sangue seco em papel filtro

As amostras de sangue seco em papel filtro (DBS; do inglês, *dried blood spots*) oferecem uma alternativa simples e fácil como amostra para sorologia e testes moleculares (TM) para HIV. Existem imunoensaios (IE) e western blot (WB) que foram otimizados para utilizar DBS como amostra. O armazenamento e o transporte do DBS devem ser realizados conforme instruções de uso do conjunto diagnóstico. As amostras coletadas em papel filtro devem ser testadas apenas com conjuntos diagnósticos que possuem registros válidos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para utilização nesse tipo de amostra (Saúde, 2014).

2.4. Técnicas moleculares mais utilizadas para diagnóstico de doenças infecciosas

a) PCR Multiplex(M-PCR)

Utilizada para analisar mais de uma região de DNA podendo identificar dois ou mais patógenos diferentes. Possibilita analisar as úlceras genitais e verificar diferentes patógenos numa mesma reação, sendo os mais frequentes *T. pallidum*, *C. trachomatis*, o Vírus Herpes Simplex e/ou *Haemophilus ducreyi*. Devido ao maior risco de transmissão da infecção por HIV em indivíduos com úlceras genitais, a terapêutica precoce é importante e mais eficaz na doença úlcero-genital.

Contudo, o tratamento orientado para cada um dos microrganismos é diferente, pois a identificação é crítica para uma terapêutica apropriada e os laboratórios procuraram desenvolver um método de PCR que permita a detecção simultânea de vários microrganismos (por exemplo, *T. pallidum*, *C. trachomatis*, *H. ducreyi*, Vírus Herpes Simplex (HSV-1 e HSV-2). A detecção dos produtos amplificados por esta técnica pode ser efetuada através da eletroforese em gel de agarose ou por uma técnica de captura, utilizando sondas de oligonucleotídeos específicos para cada um dos microrganismos e uma reação colorimétrica (Castro, 2004; Zhou et al., 2015).

Quando a M-PCR foi avaliada independentemente para cada microrganismo, a sensibilidade foi de um até 10 microrganismos e, quando na presença simultânea dos microrganismos, a sensibilidade foi de 10 microrganismos (Castro, 2014). A técnica M-PCR parece ser uma técnica promissória para o diagnóstico de úlcera genital, apresentando ainda a vantagem de permitir o diagnóstico diferencial com os outros agentes de úlceras genitais, *H. ducreyi*, HSV-1 e 2. Castro (2004) referiu que a técnica de PCR melhorou o diagnóstico das úlceras genitais reduzindo o número de diagnósticos indeterminados de 35% para 6%, tendo como o principal fator para essa diminuição, o aumento da sensibilidade da técnica e a sua capacidade para detectar microrganismos nestas amostras. A técnica foi também utilizada em outros estudos, mostrando bons resultados na discriminação destes agentes. Recentemente, a M-PCR foi usada para o diagnóstico diferencial de úlceras genitais, porém com sequências iniciadoras para genes diferentes. O estudo também mostrou uma maior sensibilidade desta técnica no diagnóstico laboratorial destas doenças (Zhou et al., 2015; Vega et al., 2016; Wohlmeister et al., 2016). A pesquisa de Vega et al. (2016), detectaram a frequência de 6 patógenos causadores de ISTs pelo método de M-PCR em amostras de swabs endocervicais. Os resultados identificaram *T. vaginalis* (14.2%), HSV-1 (8.5%), *M. genitalium* (2.41%), *N. gonorrhoeae* (2.11%), HSV-2 (1.8%), and *T. pallidum* (1.05%).

b) Reação da transcriptase reversa (RT-PCR)

A Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) fornece, a partir de uma molécula de RNA, um DNA complementar (cDNA) através do uso da enzima transcriptase reversa. A conversão de RNA em cDNA é uma das fases mais importantes para a reação, por isso é importante a escolha de uma enzima de qualidade e de *primers* que se anelem corretamente ao RNA. Esta técnica não é muito utilizada para detecção das ISTs, sendo mais usada para verificar a expressão genica, como realizado por Torres et al. (2012). O grupo identificou um defeito na regulação da expressão genica da hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), que causa a doença de Lesch-Nyhan, e ainda a detecção dos vírus de RNA da influenza aviária H5N5 e o da influenza H1N1 por um RT-PCR duplex como o realizado por Kang et al. (2010).

c) PCR em tempo real

Possibilita a visualização dos dados enquanto a reação ocorre e não apenas no final, como é o caso da PCR tradicional. Também possibilita a quantificação dos ácidos nucleicos com maior precisão e reprodutibilidade. Nesta reação são usados compostos fluorescentes que gera um sinal que aumenta a proporção direta do produto do PCR, os mais utilizados são o SybrGreen e o *Taqman*, cada um com suas vantagens e desvantagens no uso (Heymans et al., 2010). Com o uso dessa técnica é possível fazer a quantificação de carga viral de diversos vírus e a quantificação e genotipagem de algumas bactérias, como a *Chlamydia trachomatis*. Foi realizado esta técnica por Koskal et al. (2016) usando amostras de swabs urogenitais, e os resultados encontrados mostraram a presença de 13,6% do DNA de *C. trachomatis* e ainda o genótipo E (20,3%), sendo este o mais encontrado. No trabalho de Del Prete et al. (2017) investigaram a detecção simultânea de *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* e *U. parvum*, utilizando um PCR multiplex em tempo real, encontrando 28,89% de resultados positivos para pelo menos um dos patógenos pesquisados.

d) Nested PCR (nPCR)

Também é uma PCR, mas é realizada em duas reações. A nPCR proporciona um aumento da especificidade e da sensibilidade do teste, mas por outro lado, também pode aumentar possíveis contaminações na reação, se não for cuidadosamente realizada. Pope et al. (2005) utilizaram esta técnica para diagnosticar o *T. pallidum* usando primeiro um par de primers para o gene *trp* e, posteriormente, um outro que amplifica uma região interna do produto obtido pela primeira reação, possibilitando assim aumentar a sensibilidade e a especificidade do teste (Rossetti et al., 2006; Marques et al., 2003). Essa é uma técnica que quase não é utilizada para a *C. trachomatis*, pois nesse caso é usado o DNA que identifique todos os sorotipos, e posteriormente, usar a genotipagem para a diferenciação (Koskal et al., 2016).

Nos últimos anos houve uma verdadeira explosão de novas técnicas para o diagnóstico de diversas patologias através da análise do DNA, sendo estas cada vez técnicas mais simples, acessíveis e eficientes. Atualmente, pode-se analisar sequências de DNA simultaneamente e fazer um perfil dos genes de um tipo celular (Farah, 2007; Alberts et al., 2010; Grange et al., 2012).

A técnica da PCR ainda é a técnica mais usada, apesar de estar sendo aperfeiçoada a cada dia, está praticamente toda automatizada e realizada em tempo real. Esta plataforma faz diminuir o tempo e riscos de contaminações (Farah, 2007; Alberts et al., 2010; Grange et al., 2012). Os métodos de detecção mais relatados envolvem a eletroforese em gel de agarose, utilizando brometo de etídio ou sondas que envolvam o aparecimento de cor (Abreu et al., 2016).

Mesmo assim, novos métodos de diagnósticos vêm sendo desenvolvidos, sempre tentando elevar os parâmetros que são importantes para fornecer o resultado com o melhor custo benefício (Grange et al., 2012).

2.5 Coinfecções - *C. trachomatis*, HIV e HPV

Ainda hoje é difícil prevenir a infecção pelo HIV, pois as ISTs que causam inflamações em mucosas e úlceras genitais contribuem na propagação do HIV,

aumentando a infecciosidade e a susceptibilidade a essas doenças (Galvin e Cohen, 2004; Silva et al., 2014; Miranda et al., 2017).

Na presença das ISTs ocorre a potencialização da susceptibilidade dos parceiros HIV-negativos pela elevação do número de células disponíveis para invasão do HIV, e nos parceiros HIV-positivos, devido ao aumento no número de células com vírus a ser inoculado (Kaul et al., 2008). Em indivíduos infectados por HIV, as coinfeções genitais aumentam os níveis de HIV nas secreções genitais, aumentando assim a transmissão sexual secundária (Kaul et al., 2008; Kinsseger et al., 2009).

As ISTs ulcerativas proporcionam um aumento da infecciosidade para transmissão e aquisição do HIV e das ISTs. Já as coinfeções com HPV aumentam as infecções oportunistas relacionadas ao grau de imunossupressão (Silva et al., 2012; Miranda et al., 2017).

Consideradas um sério problema de saúde pública as ISTs, dentre elas a *C. trachomatis*, apresentam elevada prevalência no mundo, sendo que a coinfeção HIV-IST prolongam a infecciosidade desses indivíduos aumentando a susceptibilidade ao HIV por facilitar a sua transmissão em nível comunitário. (Miranda et al., 2017; Martins et al., 2013). Apesar de ocasionar infecções curáveis, a *C. trachomatis* está entre as cinco principais causas de procura por serviços de saúde e, quando não tratada, pode levar a doenças inflamatórias na pelve, infertilidade e gravidez ectópica. Entretanto, dificuldades no diagnóstico são verificadas devido ao seu caráter assintomático. Esta situação faz com que métodos moleculares, que apresentam maior sensibilidade e especificidade, sejam a melhor escolha para a detecção desta bactéria frente aos métodos de imunodiagnóstico. Os testes moleculares constituem uma opção de primeira linha para diagnóstico e triagem que é um dos dois principais patógenos associados às síndromes de cervicite e uretrite. Quando indicada a testagem para um o agente, sugere-se que o paciente seja também, testado para outras ISTs, em decorrência da apresentação clínica similar e da via comum de transmissão.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Verificar a coinfeção da *Chlamydia trachomatis* e do Papilomavírus Humano, em mulheres infectadas pelo HIV.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a presença da *C. trachomatis* em amostras cervicais de mulheres com HIV.
- Verificar a prevalência da infecção por *C. trachomatis* em mulheres com HIV.
- Avaliar os fatores sociodemográficos para infecção por *C. trachomatis* em mulheres com HIV.
- Associar a carga viral e contagem de linfócitos T CD4+ com a presença de *C. trachomatis* nesta população do estudo.
- Verificar a coinfeção de *C. trachomatis* com HPV na população estudada.

4. METODOLOGIA

4.1 População e amostragem

Este é um estudo observacional experimental.

As amostras de swabs cervicais que foram utilizadas para desenvolver este trabalho foram provenientes de um banco de 250 amostras do Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA/Canoas, que foram coletadas de mulheres atendidas no CTA/SAE e em unidade básica de saúde, de Caxias – MA, já utilizadas em trabalhos anteriores. Para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionadas apenas as amostras de mulheres com HIV positivo (125 amostras).

4.2 Dados Clínicos

As amostras utilizadas contêm informações tais como: idade, raça, estado civil, escolaridade e profissão/ocupação, uso de tabaco, comportamento sexual (idade da primeira relação sexual, número total de parceiros sexuais, número de parceiros sexuais no último ano, prostituição, orientação sexual e uso de método contraceptivo). Estes dados foram obtidos através de entrevistas a pacientes da unidade básica de saúde e do CTA/SAE, no momento da coleta da amostra.

Como variáveis clínicas foram consideradas: testes sorológicos pregressos para HIV, hepatites B e C e sífilis; tempo de diagnóstico para o HIV, contagem de carga viral e CD4 e dados ginecológicos e obstétricos (idade da primeira gestação, número de gestações, número e tipo de parto, número de abortos e número de filhos, exames bacteriológicos, resultados anteriores de citologia e colposcopia).

4.3 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo as amostras das pacientes com mais de 18 anos e com resultados positivo nos testes para HIV do banco amostral utilizado para este estudo, perfazendo um total de 125 amostras.

4.4 Critérios de exclusão

Foram excluídas do estudo amostras do referido banco com resultado negativo para o HIV.

4.5 Testes Moleculares

4.5.1 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada através de um Kit comercial da Roche, *High Pure Viral Nucleic Acid*. Este método é destinado para uso geral em laboratórios, pois purifica eficientemente os ácidos nucleicos a partir de soro, plasma, sangue total, swab de lesões e swabs cervicais usando volumes de amostra de até 200 µl. A extração foi realizada conforme instruções do fabricante.

4.5.2 Detecção do DNA da *Chlamydia trachomatis* por PCR

O DNA extraído foi utilizado na realização da técnica de PCR para detecção da *Chlamydia trachomatis*.

A amplificação foi realizada utilizando os *primers* CTP1 e CTP2 que amplificam um segmento de 201pb da ORF de número 4 do plasmídeo críptico da *C. trachomatis*. Este segmento localiza-se a 2940 pb do sitio único de restrição de *Bam*HI conforme descrito em Lan et al. (1993).

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

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

As amostras foram preparadas e submetidas às condições estabelecidas pelo autor, para amplificação do DNA. Foi preparada uma mistura com tampão1X, 3 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTPs, 125 ng de cada *primer* e 1U da enzima Taq DNA polimerase. Foi feita uma desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguida de uma desnaturação a 95°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto e

72°C por 1 minuto, durante 40 ciclos, e uma extensão final a 72°C por 4 minutos. O produto gerado foi de 201 pb.

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

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

4.5.3 Detecção e genotipagem do HPV

No banco amostral de onde foram selecionadas as amostras para este trabalho, estas já tinham sido analisadas quanto a presença do HPV. Nas amostras onde o resultado detectou a presença do HPV, estas foram analisadas quanto aos dez genótipos considerados de alto risco. Para a detecção do HPV foi utilizado o PCR convencional usando os primers GP5+ e GP6+ (de Roda Husman, 1995), que geram um fragmento de 150pb da região L1 do genoma do vírus. Para a genotipagem das amostras HPV positivas foi utilizada o ensaio de hibridização em microplacas. Para esse ensaio foram utilizadas sondas específicas de HPV de alto risco (HPV 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 59, 58 e 59). O protocolo utilizado para PCR e genotipagem foi realizado conforme descrito por Barcellos et al. (2011).

Os resultados obtidos para o HPV foram usados na comparação dos obtidos na amplificação para *C. trachomatis*, objetivo deste trabalho.

4.6 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos com as reações de PCR foram tabulados e analisados pelo programa SPSS v21. Análises foram realizadas para estimar a prevalência da infecção por *C. trachomatis* e a coinfeção com HPV. As diferenças de prevalência das variáveis categóricas e as análises dos dados sociodemográficos foram realizadas utilizando o teste de qui-quadrado. A razão de chance (OD) com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) para potenciais fatores de risco associados com a infecção foram estimados usando o modelo de

regressão logística. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.7 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em seres Humanos da Universidade Estadual do Maranhão com o número de protocolo nº 891.746 e do Comitê de Ética de pesquisa em seres Humanos da ULBRA (CEP-ULBRA 2007-379H).

5.RESULTADOS

Neste trabalho estão mostrados os resultados obtidos na amplificação para *C. trachomatis*. Um total de 125 amostras cérvico-vaginais foram submetidas a PCR para identificar a presença de *C. trachomatis*. Foram consideradas positivas para a PCR as amostras que após amplificação foi possível visualizar um fragmento de 201 pb. Dentre as 125 amostras analisadas por PCR para *C. trachomatis*, 21 (16,8%) apresentaram resultado positivo, conforme mostrado abaixo na Figura 1.

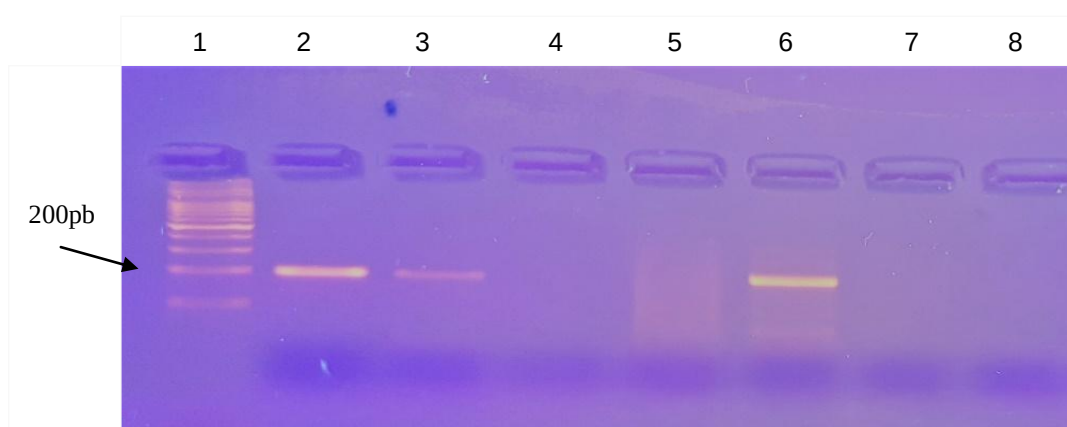


Figura 1. Imagem representativa de uma análise eletroforética em gel de agarose 2% dos produtos de PCR obtidos com *primers* específicos para *C. trachomatis* a partir de amostras cérvico-vaginais. 1: marcador de tamanho molecular 100pb. 2. controle positivo da reação; 3 e 6 amostras positivas para *C. trachomatis*; 4,5 e 7 amostras negativas para *C. trachomatis*; 8. controle negativo da reação.

As características sociodemográficas, comportamentais e clínicas das 125 mulheres estão apresentadas na Tabela 3. A idade variou de 17 a 70 anos, e a média ficou em 37,4 anos. Com relação ao estado civil e escolaridade verificou-se que 58,4% eram casadas ou viviam em união estável, 62,4% tinham de 1 a 9 anos de estudo e 88,0% se declaram pardas e/ou negras. Quanto as características comportamentais, verificou-se que 61,6% tinham 1 parceiro no último ano, 38,4% usavam anticoncepcional oral e 84,9% relataram não fumar.

Tabela 3. Características sociodemográficas da população estudada.

Variável	N	%
Idade		
17 a 25 anos	22	17,6
> 26 anos	103	82,4
Estado Civil		
Casada e união estável	73	58,4
Solteira, separada e viúva	52	41,6
Escolaridade		
Nenhuma	19	15,2
1 a 9 anos	78	62,4
Mais de 9 anos	28	22,4
Parceiros Sexuais*		
0	41	32,8
1	77	61,6
2 ou mais	7	5,6
Fumo		
Não	107	85,6
Sim	18	14,4

* Quantidade de parceiros sexuais no momento da coleta

A Tabela 4 mostra as características clínicas das pacientes, onde verificou-se que 72,2% tinham carga viral de até 1000 cópias/mL, 73,6% o CD4 era maior de 350 células/mm³. Nas análises relacionadas a presença do HPV e seus genótipos, observou-se que em 44,8% tinham a infecção por HPV, e os genótipos mais prevalentes foram o HPV18 (96,4%), 16 (89,3%), 58 (46,4%) e 56 (33,9%). Em várias destas amostras foi possível observar a presença de dois ou mais genótipo simultaneamente (Tabela 6).

Tabela 4. Características clínicas da população estudada.

Variável	N	%
Carga Viral		
Até 1000 cópias/mL	91	72,8
Mais de 1000 cópias/mL	34	27,2
CD4		
Até 350 células/mm ³	33	26,4
Mais de 350 células/mm ³	92	73,6
Tratamento Antiretroviral		
Sim	93	74,4
Não	32	25,6
HBsAg		
Negativo	120	96,0
Positivo	5	4,0
VDRL		
Negativo	113	90,4
Positivo	12	9,6
HPV		
Sim	56	44,8
Não	69	52,2
Genotipagem		
HPV16	50	89,3
HPV18	54	96,4
HPV31	4	7,1
HPV33	16	28,6
HPV39	5	8,9
HPV45	2	3,6
HPV52	1	1,8
HPV56	19	33,9
HPV58	26	46,4
HPV59	6	10,7

As características sociodemográficas e comportamentais das pacientes são apresentadas na Tabela 5. Apesar das diferenças observadas entre o grupo com e sem infecção por *C. trachomatis* essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Tabela 5 – Características sociodemográficas e comportamentais das amostras com e sem a infecção por *C. trachomatis* em mulheres HIV positivas.

Variável	<i>C. trachomatis</i>			P -value
	Positivo – N (%)	Negativo – N (%)	OD (ID95%)	
Idade			2,967(1,028-8,558)	0,038
17 a 25 anos	7 (33,3)	15 (14,4)		
>25 anos	14 (66,7)	89 (85,6)		
Raça			1,357(0,283-6,514)	0,702
Parda/Negra	19 (90,5)	91(87,5)		
Branca/Amarela	2 (9,5)	13 (12,5)		
Escolaridade				0,617
Nenhum	2 (9,5)	17(16,3)		
1 a 9 anos	13 (61,9)	65 (62,5)		
>10 anos	6 (28,6)	22 (21,2)		
Situação Conjugal			0,940(0,364-2,426)	0,898
Solteira	12 (57,1)	61(58,7)		
Casada	9 (42,9)	43 (41,3)		
Fumo			1,727(0,366-8,149)	0,485
Não	19(90,5)	88(84,6)		
Sim	2(9,5)	16(15,4)		
Uso Contraceptivo Hormonal				0,387
Sim	5(23,8)	34(32,7)		
Não	7(33,3)	41(39,4)		
Outros	9(42,9)	29(27,9)		
Parceiros Sexuais				0,443
0	8(38,1)	33(31,7)		
1	13(61,9)	64(61,5)		
>2	0(0)	7(6,7)		

Com relação à análise das variáveis sociodemográficas foi observado diferenças significativas somente na idade das pacientes ($p=0,038$).

Outros fatores sociodemográficos, como raça, escolaridade, situação conjugal, uso de anticoncepcional, quantidade de parceiros e habito de fumar não tiveram valores estatisticamente significativos, o que não descarta uma possível associação, pois o número de participantes no estudo é considerado pequeno, o que impede encontrar valores de p significativos em testes estatísticos.

Das pacientes com infecção por *C. trachomatis*, 66,7% tinham mais de 25 anos, 90,5% eram pardas ou negras; 61,9% estudaram o ensino fundamental completo ou não, 90,5% relataram não fumar, 76,7% faziam uso de algum método contraceptivo, sendo que dentre estas, 23,8% usavam anticoncepcional hormonal e 61,9% tinham um parceiro sexual nos últimos seis meses.

Avaliando as características clínico-patológicas, a Tabela 6 descreve essas variáveis nas amostras das mulheres HIV positivas considerando a presença ou não da infecção por *C. trachomatis*.

Tabela 6. Aspectos clínicos patológicos avaliados das mulheres do estudo

Variável	<i>C. trachomatis</i>			
	Positivo – N (%)	Negativo – N (%)	OD (ID95%)	P –value
Carga Viral			0,542 (0,202-1,452)	0,219
Até 1000 cópias/mL	13 (61,9)	78 (75,0)		
> 1000 cópias/mL	8 (38,1)	26 (25,0)		
CD4			1,141 (0,402-3,238)	0,805
Até 350 cell/mm	6 (28,6)	27 (26,0)		
> 350 cell/mm	15 (71,4)	77 (74,0)		
Tratamento Antiretroviral			0,633 (0,230-1,742)	0,373
Sim	14 (66,7)	79 (76,0)		
Não	7 (33,3)	25 (24,0)		
HBsAg			0,825 (0,760-0,896)	0,305
Negativo	21(17,5)	99 (82,5)		
Positivo	0	5 (100,0)		
VDRL			0,568 (0,140-2,306)	0,424
Negativo	18 (15,9)	95 (84,1)		
Positivo	3 (25,0)	9 (75,0)		
HPV			0,718 (0,275-1,878)	0,498
Positivo	8 (38,1)	48 (46,2)		
Negativo	13 (61,9)	56 (53,8)		
GENOTIPAGEM				
HPV16			0,840 (0,744-0,948)	0,290
SIM	8 (16)	42 (84)		
NÃO	0(0)	6 (100)		
HPV18			0,852 (0,762-0,952)	0,557
SIM	8 (100,0)	46 (87,5)		
NÃO	0(0)	2 (12,5)		
HPV31			1,182 (1,052-1,327)	0,397
SIM	0(0)	4 (8,3)		
NÃO	8(100,0)	44 (91,7)		
HPV33			0,314 (0,035-2,787)	0,277
SIM	1 (12,5)	15 (31,25)		
NÃO	7 (87,5)	33 (68,75)		
HPV39			1,186 (1,054-1,335)	0,339
SIM	0 (0)	5 (10,4)		
NÃO	8 (100,0)	43 (89,6)		
HPV45			6,714 (0,376-120,006)	0,142
SIM	1 (12,5)	1 (2,1)		
NÃO	7 (87,5)	47 (97,9)		
HPV52			1,170 (1,049-1,348)	0,680
SIM	0 (0)	1 (2,1)		
NÃO	8 (100,0)	47 (97,9)		
HPV56			0,608 (0,110-3,348)	0,565
SIM	2 (25,0)	17 (35,4)		
NÃO	6 (75,0)	31 (64,6)		
HPV58			0,652 (0,140-3,040)	0,584
SIM	3 (37,5)	23 (47,9)		
NÃO	5 (62,5)	25 (52,1)		
HPV59			1,229 (0,124-12,142)	0,860
SIM	1 (12,5)	5 (10,4)		
NÃO	7 (100,0)	43 (89,6)		

Com relação a carga viral, esta apresentou-se indetectável ou menor que 1000 cópias/mL em 61,9% das mulheres com a infecção e em 75,0% nas não infectadas. O CD4 foi maior que 350 células/mm³ em 71,4% das infectadas e em 74,0% das não infectadas. Essas características não tiveram associação com a infecção ($p=0,219$ e $p=0,805$).

Prosseguindo o estudo, examinou-se a possível existência de coinfeção entre *C. trachomatis* com HPV e seus genótipos de alto risco, afim de verificar se nesta população de mulheres HIV positivas, a presença do HPV teria influência na aquisição da infecção pela *C. trachomatis*. Foi encontrado 10,4% de coinfeção entre estes microrganismos e este dado permite dizer que a presença do HPV não foi um fator de risco, visto que em 44,8% das amostras com HPV positivo o valor de p ficou em 0,498.

Com relação aos genótipos, observou-se uma maior prevalência do 18, 16, 58 e 56, porém em nenhum deles os resultados foram estatisticamente significativos. Mas se levarmos em conta o risco relativo com intervalo de confiança de 95% (OR, IC95%), temos o genótipo 16 e 18 associados a infecção (OR=0,840 OR=0,852 respectivamente), e os 31, 39 e 52 como proteção a infecção por *C. trachomatis* (OR=1,182, OR=1,186 e OR=1,170 respectivamente).

Para verificar quais os possíveis fatores que poderiam estar associados na infecção entre a *C. trachomatis* e o HPV, este estudo utilizou os fatores sociodemográficos desta população, analisando somente os resultados positivos para a *C. trachomatis*. Os dados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Fatores sociodemográficos e comportamentais associados com infecção por *C. trachomatis* e HPV positivos e negativos.

<i>C. trachomatis</i> positivo					
	HPV – positivo N (%)	HPV – negativo N (%)	OD	IC – 95%	P
Idade			3,33	0,502-22,142	0,204
17 a 25 anos	4 (50,0)	3 (23,1)			
> 26 anos	4 (50,0)	10 (76,9)			
Raça			0,316	0,163-0,612	0,058
Parda/negra	6 (75,0)	13 (100,0)			
Branca/amarela	2 (25,0)	0 (100,0)			
Escolaridade					0,678
Nenhuma	1 (12,5)	1 (7,7)			
1 a 9 anos	4 (50,0)	9 (69,2)			
> 9 anos	3 (37,5)	3 (23,1)			
Fumo			0,58	0,031-10,863	0,716
Não	7 (87,5)	12 (92,3)			
Sim	1(12,5)	1 (7,7)			
Situação Conjugal			0,604	0,105-3,707	0,604
Casada	4 (50,0)	8 (61,5)			
Solteira	4 (50,0)	5 (38,5)			
Parceiros Sexuais			0,387	0,056-2,697	0,332
Nenhum	2 (25,0)	6 (46,2)			
1	6 (75,0)	7(553,8)			
Uso de contraceptivo hormonal					0,806
Não	2 (25,0)	3 (23,1)			
Sim	2 (25,0)	5 (38,5)			
Outro método	4 (50,0)	5 (38,5)			

Considerando apenas os casos de coinfeção *C. trachomatis* e HPV, a idade não foi um diferencial, pois 50,0% tinham mais de 25 anos. Dentre as que tinham coinfeção, 75,0% eram pardas e negras, 50,0 estavam casadas ou vivendo em união estável, 50,0% estudaram de 1 a 9 anos, 87,5% não fumavam e 75,0% possuíam apenas um parceiro sexual nos últimos seis meses. Estes dados foram similares aos encontrados na análise quando a infecção foi observada somente para *C. trachomatis*.

6.DISSCUSSÃO

Os estudos sobre a prevalências das infecções sexualmente transmissíveis tem aumentado nos últimos anos, tanto no Brasil, quanto no mundo. O avanço da medicina promoveu uma grande sobrevida aos pacientes com HIV mantendo a carga viral em níveis indetectáveis ou muito baixa, o que ocasiona uma diminuição do risco de sua transmissão, estes fatores provocam a diminuição do uso de preservativos como método de prevenção. Porém a transmissão de outras doenças sexuais como a sífilis, a gonorreia e a clamídia aumentaram drasticamente. Como essas doenças são assintomáticas por um longo período acabam causando graves implicações na saúde (Miranda et al., 2017; Park et al., 2017).

As ISTs, historicamente, apresentam-se como um grande desafio para o diagnóstico por testes laboratoriais, tanto pela dificuldade na obtenção de amostras clínicas, que muitas vezes é invasiva e dolorosa, quanto pelo inconveniente de obter o cultivo como é o caso da *C. trachomatis*. Entretanto, com o desenvolvimento dos testes de amplificação de ácidos nucleicos, que são mais sensíveis que os tradicionais, eliminou-se a necessidade do cultivo bacteriano possibilitando um diagnóstico através do uso de amostras colhidas por métodos pouco invasivo, como as amostras cervicais (Koskal et al., 2016; Miranda et al., 2017).

Este estudo usou como método molecular a técnica de amplificação de ácidos nucleicos para detectar a *C. trachomatis* de 125 mulheres portadoras do vírus HIV, sendo que destas, 56 também apresentavam o vírus HPV. Nesta análise foi identificado o DNA de *C. trachomatis* em 21 das 125 amostras analisadas, representando na população estudada uma prevalência de 16,8%.

O resultado observado foi considerado superior ao relatado na literatura em trabalhos realizados em outros países como o Estados Unidos, onde a prevalência da infecção foi de 4,7%. No Brasil, as prevalências variaram de 2,1% a 13,6%, em estudos com uma população de mulheres abaixo dos 25 anos (Torrone et al., 2014) e em adolescentes, mulheres grávidas e em mulheres vivendo com HIV/AIDS. (Travassos et al., 2012; Pinto VM et al., 2012; Angelova et

al.,2016; Miranda et al., 2017). Na publicação de Protos et al (2014), apresentaram dados de um estudo envolvendo mulheres submetidas a reprodução assistida que mostra uma frequência bem superior aos estudos citados anteriormente (40,0%), podendo ser este um indicativo de que a *C. trachomatis* é uma potente bactéria causadora de infertilidade em mulheres.

Nosso estudo foi restrito a uma população de mulheres com HIV atendidas em um centro especializado em uma cidade polo do Sul do Maranhão, sendo a média de idade foi de 37,4 anos, o que se mostrou como um fator de risco para a presença da infecção, $p=0,038$, $OD=2,967(1,028-8,558)$, corroborando com dados da literatura (Silva et al., 2012; Miranda et al., 2017 e Zhu et al., 2017). Estes dados também se encontram de acordo com o Ministério da Saúde (MS) (Wohlmeter et al., 2016), onde a faixa etária com maior frequência de mulheres infectadas pelas ISTs situa-se entre 20 a 39 anos, sendo possível dizer que mulheres em idade sexualmente ativas tem um maior risco de contrair essas infecções.

No Brasil a infecção por *C. trachomatis* não é uma doença de notificação compulsória e, portanto, a poucos dados confiáveis sobre a real prevalência da mesma. Também não existem programas específicos do MS, que incentivem o rastreio, e por ser assintomática na maior parte dos casos, provavelmente é subdiagnosticada e conseqüentemente pouco tratada, podendo justificar os altos índices encontrados neste estudo. As estimativas de prevalência da *C. trachomatis* devem ser interpretadas levando-se em conta as diferenças nacionais e culturais de comportamento sexual e assistência à saúde. O Brasil é um país de dimensão continental, com populações de diferentes níveis de desenvolvimento socioeconômico, o que justificaria as diferenças regionais encontradas (Redmond et al., 2015; Saúde, 2016).

Quanto aos outros fatores sociodemográficos, como a quantidade de parceiros, e a situação conjugal, apesar de não encontrarmos dados estatisticamente significativos, verificamos uma maior quantidade de infecção por *C. trachomatis* em pacientes que relataram ter um único parceiro (61,6%), casadas ou vivendo em união estável (58,4%), de raça parda e ou negra (88,0%) e com escolaridade de 1 a 9 nos (62,4%), o que concorda com o relatado em

Travassos et al. (2012), Angelova et al. (2016), Anaene et al. (2016) e Miranda et al. (2017), e que discorda do encontrado em Pinto et al. (2011) e Silva et al. (2012), onde uma intensa atividade sexual, com múltiplos parceiros foi apontado como fator de risco. Essa população estudada, é de mulheres que já fazem um acompanhamento constante, por serem portadoras do HIV, e assim tenderiam a ter um acesso mais fácil ao diagnóstico de outras ISTs, e se esperaria fazerem uso frequente de métodos preventivos, o que mostrou não ser a realidade.

No caso do HIV, tanto as mulheres que possuem o vírus quanto as que não possuem, foi observado que esta situação pode também ser um fator que poderia aumentar a prevalência, pois apesar dessas pacientes terem mais acesso a consultas médicas, acabam deixando no esquecimento algumas doenças assintomáticas, como é o caso da *C. trachomatis*. A mulher com HIV que se infecta com alguma IST, tende a aumentar a carga viral e assim aumenta o risco de contaminação (Travassos et al., 2012). No nosso estudo, 72,2% das pacientes tinham carga viral <1000 cópias/mL, e 74,4% estavam fazendo uso de algum antiretroviral, o que comprova que a maioria já apresentava sintomas, e com o uso do antiretroviral estavam com a quantidade do vírus HIV controlada. Portanto, essas pacientes apesar de estarem sendo assistidas a algum tempo, com consultas e exames frequentes ainda assim deixam passar doenças assintomáticas, que podem ter desfechos graves no futuro e ainda aumentarem a transmissão, tanto das ISTs como do HIV. Travassos et al. (2012) identificaram que quanto maior a carga viral e menor o CD4, maior o risco de infecção por ISTs, indicativo do comprometimento do sistema imunológico, portanto, facilitando a transmissão.

Seguindo nas análises, os resultados observados relacionados a infecção pelo HPV, foi possível verificar que esta não está relacionada como fator de risco para infecção por *C. trachomatis* em mulheres HIV positivos ($p=0,498$). Mesmo assim, encontramos HPV em 44,8% das mulheres estudadas e em apenas 10,8% delas estavam com coinfeção com *C. trachomatis*. Diferente do encontrado por Wohlmeister et al. (2016), que encontraram 2,4% de coinfeção, mas o estudo utilizou somente amostras com alterações intraepiteliais.

Com relação aos genótipos de alto risco, estes foram analisados nas amostras que apresentaram coinfeção HPV e *C. trachomatis*, sendo que os mais encontrados foram o 16 e o 18 (100,0%). Estes resultados corroboram com os encontrados por Wohlmeister et al. (2016), onde a frequência dos genótipos 16 e 18 foram os mais encontrados nas amostras com HPV e *C. trachomatis*.

Finalizando o estudo, investigamos a coinfeção com a sífilis, como fator de risco para a *C. trachomatis*, onde não foram encontrados valores estatisticamente significativos. Mas se analisarmos as pacientes com coinfeção HPV e *C. trachomatis*, a sífilis se apresenta como fator de risco, evidenciando que a presença de uma IST contribui para a transmissão de outras. A *C. trachomatis* é uma doença na maioria das vezes assintomática, mas nem por isso deixa de causar alterações epiteliais que facilitam a passagem de outros patógenos.

Uma limitação deste estudo foi o número pequeno de participantes. Alguns fatores de risco podem não ter dado informações estatisticamente significativas entre algumas variáveis independentes para a infecção por *C. trachomatis*, e também a possibilidade de respostas tendenciosas ao responder o questionário da pesquisa.

7.CONCLUSÃO

- ◆ A prevalência da *C. trachomatis* nesta população foi maior do que a encontrada em outros estudos brasileiros, o que mostra a susceptibilidade e a vulnerabilidade destas pacientes, que apesar de assistidas pela unidade de saúde, ainda assim deixam passar doenças assintomáticas.
- ◆ A presença do HPV juntamente com a *C. trachomatis*, não foi considerado como fator de risco, pois os resultados não mostraram ser estatisticamente significativos, apesar de quase metade das mulheres estarem co-infectadas pela *C. trachomatis* e HPV.
- ◆ Este estudo identificou uma alta prevalência de infecção por HPV 18, 16, 58 e 56, todos de alto risco e nas coinfeções o mais prevalente foi o HPV 16 e 18. Esta condição em mulheres imunodeprimidas, caracteriza essa população como de risco para evolução do câncer cervical. Cabe salientar que essa situação já seria o suficiente para justificar o desenvolvimento de estratégias específicas no controle da saúde sexual dessa população, pois na maioria das vezes só é disponibilizado o exame de citologia oncológica.
- ◆ Dentre os fatores sociodemográficos apenas a idade foi considerada fator de risco, embora outros fatores se mostrarem importantes. Avaliar melhor esses fatores é um importante meio de auxiliar a diminuição da prevalência dessas doenças tanto na população vivendo com HIV/AIDS, como também na população em geral.
- ◆ Apesar de não encontrarmos significância estatística entre as condições clínicas e a infecção por *C. trachomatis*, esta foi encontrada numa porcentagem maior nas pacientes mais imunodeprimidas.
- ◆ O rastreamento e a detecção das ISTs assintomáticas ou não, na população vivendo com HIV/AIDS e na população em geral, são de extrema importância para o controle da expansão da epidemia das ISTs e AIDS.

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

8. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Ageron AG, Combescure C, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger T. Comparation of diagnostic accuracy of PCR targeting the 47-kilodalton protein membrane gene os *Treponema pallidum* and PCR targeting the DNA polymerase I gene: Systematic review and Meta-analysis. *J Clin Microbiol.* 2015;53(11):3522-29.

Ageron AG, Frederic L, Schrenzil J, Cherton B, Getaz GJ, Tongamo M, Ferry T, Sednacul P, Lauteschlger S, Trelu LT, et al. Perfonmance of the 47 kilodalton membrane protein versus DNA polymerase I genes for detection of *Treponema pallidum* by PCRin ulcers. *J Clin Microbiol.* 2015;53(3):976-80.

Ageron AG, Ninet B, Trollu LT, Tensvhlager S, Furrer H, Piguet V, Schrenzel J, Herschel B. Assessment of a real time PCR to diagnose syphilis fron deversi biologicalsample. *Sex Transm Infect.* 2009;85:264-269.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia Molecular da Celula.* 5th ed. Porto Alegre: Artemed; 2010.

Anaene M, Sayeme K, Caskey R. Factor associated with the over-treatment and under-treatment of Gonorrhea and Chlamydia in adolescents persenting to a public hospital emergency department. *Int J Infct Dis.* 2016;53:34-38.

Andrade ACR, Teles RAS, Silva AMHP, Dias BHM, Vasconcelos Filho FEd, Amaral RLG, Linhares IM, Eleutério Junior J. Infecção genital por *Chlamydia trachomatis* na mulher: epidemiologia, diagnóstico e consequencias. *RFM- Revista Fluminense de Medicina - FJM - Fluminense Journal of Medicine.* 2014;78-79(2):15-17.

Angelova M, Chev EK, Tsankova V, Koleva I, Mangareva S. Role. and importance of *Chlamydia trachomatis* in pregmant patient. *J Med Sci* 2016;15-

4(3):410-12.

Aragao C, Casal D, Silva MOd, Costa IB, Araujo EdC, Corveio TCdO. Molecular detection of *Treponema pallidum* sp. in blood samples of VDRL-seroreactive women with lethal pregnancy outcomes: A retrospective observational study in Northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011;44(4):451-456.

Avelleira JCR, Bahino G. Sífilis: Diagnóstico, tratamento e controle. *Rev An Bras Dermatol*. 2006;81(2):111-26.

Baral K, Osaki S., Shreshta B., Ponta C.R., Boulter A., Pong F., Cevalles V., Schachter J., Lietman T. Reliability of clinical diagnoses in identifying infectious trachomatis in a low prevalence area of Nepal. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999;77(6):461-466.

Barcellos RB, Almeida SE, Sparhacki RD, Verza M, Rosso F, Medeiros RM. Evaluation of a novel microplate colorimetric hybridization genotyping assay for human papillomavirus. *J Virol Methods*. 2011;177:38-43.

Barros CCd, Schneider A. Patologia geral da nutrição. Acesso em 20/08/17 <http://wp.ufpel.edu.br/patologiageralnutricao/> .

Becker D. Detecção de *Chlamydia trachomatis* em amostras cervicais por reação em cadeia da polimerase. Dissertação de mestrado do programa de pós graduação em Biologia celular e molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre 2005.

Bianchi S, Frati ER, Canuti M, Calzani D, Fasoli E, Amendola A, Tanzi E. Molecular epidemiology and genotyping of *Chlamydia trachomatis* infection in a cohort of young asymptomatic active women (18-25 years) in Milan, Italy. *J Prev Med HYG*. 2016;57:128-34.

Blan J, Tu U, Wang XY, Li C. Evidence that TP-0144 at *Treponema pallidum* is a thiamine binding protein. *J Bacteriol.* 2015;197(7):1164-72.

Brasil. Boletim Epidemiológico da Sífilis 2015. Ministério da Saúde; 2015.

Brasil. Boletim Epidemiológico da Sífilis. Ministério da Saúde; 2016.

Brasil. Laboratory diagnosos of sexually transmiitedinfections including human immunodeficiency virus. OMS - Ministério da Saúde; 2013.

Brasil. Manual Técnico para o Diagnóstico da Sífilis. Ministério da Saúde - PNCQ; 2016.

Brasil. Portaria nº 3.242 de 20 de dezembro de 2011. Dispõe sobre o fluxograma labortorial da sífilis e a utilização de testes rapidos para a triagem da sífilis em situações especiais e apresenta outras recomendações. 2011.

Brasil. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecção Sexual Tranmissivel. 2015.

Brasil. Sífilis - Estrategias para diagnsótico no Brasil. Apostila. Ministério da Saúde; 2010.

Brasil. Teste Rapido - HIV E Sífilis. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilancia em Saúde; 2015.

Burd EM. Human Papillomavirus and cervical cancer. *Clin. Microbiol Rev.* 2003;16(1):1-17.

Carlson jA, Dabiri G, Cribier B, Sell S. The immunopathology of syphilis: The manifestation and course os syphilis are determided by the level of delayed - Type hipersensitivity. *Institutes National of health - AM J. Dermatopathol.* 2011;33(5):433-60.

Carvalho NS, Perogano MG, Takimura M, Oliveira Jr FC. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* at pregnant admitted in the public health maternity. DST - J Bras Doenças Sex Transm. 2010;22(3):141-144.

Castro MRTd. Contribuição para o estudo da infecção por *Treponema pallidum* subespecie *pallidum*: Resposta sorológica, Diagnóstico Molecular e Genotipagem. Dissertação de Doutorado. Lisboa - Portugal (LISBOA): Universidade Nova Lisboa; 2004.

Castro R, Aguas MJ, Batista T, Araujo C, Mansinho K, Pereira FdLM. Detection of *Treponema pallidum* Sp. *Pallidum* DNA in Cerebrospinal Fluid (CSF) by to PCR Techniques. J Clin Lab Anal. 2016:1-5.

Chen CY, Chi KH, Satva AS, George RW, Cox DL, Silva MR, Carneiro F, Lauwers GY, Ballerd R. Diagnosis of gastric syphilis by direct immunofluorescence staining and Real time PCR testing. J Microbiol. 2006;44(9):3452-56.

Cumpariondo MP, Farchi F, Ciccozzi M, Denoro A, Gallone D, Marachioni F, Favalli C, Ciotti M. Detection of HPV and co-infecting pathogens in healthy Italian women by multiplex real-time PCR. Infez Med. 2016;1:12-17.

Davies B, Turner KME, Yu BN, Leung S, Frolund M, Benfield T, Blanchard J, Westh H, Ward H. Comparison at the population excess fraction of *Chlamydia trachomatis* infection on pelvic inflammatory disease at 12-months in the presence and absence of *Chlamydia* testing and treatment systematic review and retrospective cohort analyses. PLOS-ONE. 2017;15:1-12.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, Van der Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. J Gen Virol. 1995;76:1057-62.

Del Prete R, Ronga L, Lestingi M, Addati G, Angelotti UF, Di Carlo D, Miragliotta G. Simultaneous detection and identifications os STI pathogens by multiplex Real-Time PCR in genital tract specimens in a seleted area of Apulia, a region of Southern Italy. J Infect. 2017;45(4):469-77.

Farah SB. DNA Segredos e Misterios. Sao Paulo: Sarvier; 2007.

Fraga Dd, Goldini LZ. Detecção do Treponema pallidum em Liquido Cefalorraquidiano LCR pela reação em cadeia de polimerase PCR em pacientes HIV positivos assintomaticos com diagnsotico de sífilis latente. Dissertação para titulo de Mestre. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

Freitas K. Acessada em 10/08/17 www.drakeilafeitas.com.br/como-fazer-o-diagnostico-do-hiv .

Garces AX, Martinez AMB, Gonçalves CV, Germano FN, Barral MFM, Vieira VC. Prevalence of Chlamydia trachomatis and risk factors. Rev Bras Ginecol Obstet. 2013;35(8):379-83.

Garcia P, Grassi B, Fich F, Salvo A, Araya L, Abarzua F, Soto J, Poggi H, Vasquez P, Leon EP, et al. Diagnsotico de la infeccion por Treponema pallidum em pacientes com sífilis temprana y neurosífilis medicate reaccion de la polimerase em cadena. Rev Chile Infect - www.shachint.cl. 2011;28(4):310-15.

Giustina ACBD, Coelho LCB, Filho VSdA. Utilização de ondas sonicas e ultra sonicas para obtenção de DNA em amostras de musculo humano. Recife: Universidade de Pernambuco; 2009.

Granato CFH. Saiba+ Anais - Boletim do grupo Fleury. 2013 Agosto.

Grange PA, Dian PL, Farchi D, Benhaddau N, Gressier L, Gerhardt P, Marini JP, Deleuze J, Pantoja C, Bianchi A, et al. Evaluation of a PCR test for

detection at *Treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):546-52.

Grinstein B, Bastos FI, Velasco VG, et al. Assessing sexually transmitted infections in a cohort of women living with HIV/AIDS, in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J STD AIDS.* 2006;17:473-78.

Guedes F, Franca SdF, Silva VHdA. BG 380 Genética Fisiológica e Molecular - Roteiros de aulas práticas. Apostila. Universidade Estadual de Campinas.

Heymans R, Helm Vd, Vries JCd, Fennema HSA, Coutinho RA, Bruisten SM. Clinical Value of *Treponema pallidum* real-time PCR for diagnosis of syphilis. *J Clin Microbiol.* 2010;48(2):497-502.

Hsu PL, Chamberlain NR, Orth K, Moomaer CR, Zang LQ, Slaughter CA, Rodolf JD, Sell S, Norgard MV. Sequence analysis of the 47-Kilodalton major integral membrane. *Infect Immun.* 1989;57(1):196-203.

Igansi CN. Prevalência do papiloma vírus humano (HPV) e *Chlamydia trachomatis* (CT) e sua associação com lesões cervicais em uma amostra de mulheres assintomáticas de Porto Alegre, Brasil. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina; 2005.

Ishak MdOG, Ishak R. O impacto da infecção por *Chlamydia* em populações indígenas da Amazônia brasileira. *Cad. Saúde Pública.* 2001;17(2):385-396.

Janssen KH, Hoebe CJPA, Hurlers NHTMD, Eppings L, Lucchesi M, Wolfs PFG. Viability -PCR shows that NAAT detects a high proportion of DNA from non-viable *Chlamydia trachomatis*. *PLOS-ONE.* 2016;9:1-9.

Jiang C, Zhao F, Xiao J, Zeng T, Yao J, Ma X, Wu H, Wu Y. Evaluation of the recombinant protein TpF1 of *Treponema pallidum* for serodiagnosis of syphilis.

Clinical and Vaccine Immunology - Journal ASM ORG. 2013;20(10):1563-68.

Kang XP, Jeang T, Li YQ, Lin F, Liu H, Chang GH, Zhu QY, Qin EdQ, Qin CF, Yang YH. "A duplex real-time RT-PCR assay for detecting H5N1 avian influenza virus and pandemic H1N1 influenza virus. Virol J. 2010;7(113):1-4.

Kaul K, Pittengell C, Sheth PM, Sunderji S, Beringer A, MacDonald K. The genital tract immune milieu: an important determinant of HIV susceptibility and secondary transmission. J Reprod Immun. 2008;77(1):32-40.

Kissinger P, Almeida A, Clark RA, Dumestre J, Theall KP, Myers L. Trichomonas vaginalis treatment reduces vaginal HIV-1 shedding. Sex Health. 2009;36(1):11-16.

Koksal MO, Beka H, Domirci M, Kadioglu A, Agactidan A, Akgul B. Prevalence and genotyping of chlamydia trachomatis in symptomatic male patients from Istanbul, Turkey. Springer Plus. 2016;5:1706.

Krishnan A, Sabrena S, Bhat Pv, Kamath V, Hindol M, Zadeh VR, Arunkumar G. Detection of genital chlamydial and gonococcal infection using urine samples: A community-based study from India. J Infect Public Health. 2017; S1876-0341(17)30132-6.

Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B. New tests for syphilis: Rational design of a PCR method for detection of Treponema pallidum in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. J Clin Microbiol. 2001;39(5):1941-46.

Madeira LdS, Silva MSN. Comparação de Métodos Laboratoriais para diagnóstico da Sífilis. Canoas - RS: ULBRA; 2015.

Marques EK. Diagnóstico Genético Molecular. Ulbra; 2003.

Martim IE, Tsang RS, Sutherland K, Tilley P, Read R, Anderson B, Roy C, Singh AE. Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: Azithomycin resistance and detection of *Treponema pallidum* DNA in whole-blood sample versus ulcerative swabs. *J Microbiol.* 2009;47(6):1668-73.

Martins PP, Pereira. Métodos de diagnóstico da infecção pelo Virus do Papilomavirus Humano. Monografia. Lisboa 2013.

Maschmann RdA, Silva MSN, Verza M, Sperhack RD, Ribeiro MO, Gomes HM, Suffys PN, Tortoli E, Marcelli F, Zaha A, et al. Detections of rifampin resistant genotypes in *Mycobacterium tuberculosis* by reverse hybridization ASSAY. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(2):139-45.

Maurissa MI. Identificação e Genotipagem de *Treponema pallidum* subsp *pallidum* em amostras clínicas. Dissertação de Mestrado. Lisboa - Portugal: Universidade de Lisboa - Faculdade de Ciências; 2009.

Meyer T. Diagnostic procedures to detect *Chlamydia trachomatis* infections. 2016 acessada em 2/2017. www.mdpi.com/journal/microorganisms .

Miranda AE, Silveira MF, Travassos AG, Tenório T, Val ICCd, Lannoy Ld, Junior HSdM, Carvalho NSd. 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):402-07.

Neves D, Sabido M, Benzaken CB, Jardim L, Ferreira C, Lituriondo A, Santos CGd, Benzaken AS. Evaluation of screening for *Chlamydia trachomatis* among young women in primary health care services in Manaus, Amazonas state, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2016;32(10):1-10.

Noda MF, Marin YR, Hernandez MdLAR, Menendez MH. Infección por *Chlamydia trachomatis* como cofactor en la etiología del cáncer cervical. *Rev.*

Cubana Obestet Ginecol. 2014;40(1).

Park J, Zimmerman L, Stempinski K, Bridge R, Roston A, Patel A. Prevalence of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in a urban public hospital pregnancy termination clinic. Int J STD AIDS. 2017;28(2):1164-68.

Passos MRL. Chlamydia trachomatis: A epidemia silenciosa. Em Foco. 2003.

Passos MRL, Benzaken AS, Coelho ICB, Rodrigues GHS, Junior JCD, Varella RQ, Tavares RR, Barreto NA. Estudo da equivalência entre azitromicina e penicilina G benzatina no tratamento da sífilis. Dst. J Bras DST. 2004;16(1):52-56.

Piazzetta RCPS, Carvalho NSd, Andrade RPd, Piazzetta G, Carneiro R. Prevalencia da infecção por chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhea em mulheres sexualmente ativas em uma cidade do sul do Brasil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2011;33(11):328-33.

Pinto M, Antelo M, Ferreira R, Azevedo J, Santo I, Borega MJ, Gomes JP. Carga treponemica em amostra biológicas correspondentes a diferentes fases clínicas da sífilis. Inti Nac Saúde. 2016: 15-18.

Pinto VM, Scwarcwald CL, Banoni C, Stinguri LL, Inocencio LA, Miranda AC. Chlamydia trachomatis prevalence and risk behavior in parturient women age 15 a 24 in Brazil. Sex Health. 2011;38(10):957-61.

Pope V, Fox K, Liu H, Marfin AA, Leone P, Sena AC, Chapin J, Fears MB, Markowitz L. Molecular subtyping of Treponema pallidum from North and South Carolina. J Clin Microbiol. 2005;43(8):3743-46.

Proto IAC, Carneiro JdM, Passos XS, Ataídes FS, Amaral WNd. Prevalência de Chlamydia trachomatis em mulheres submetidas à fertilização assistida em

Goiânia. Soc Bras Rep Hum. 2014;28(3):108-11.

Redmond SM, Kissilg KA, Woodhall sC, Brock IVFvd, Bergin JV, Word H, Uuskula A, Hermann B, Andersen B, Gotz Hm, et al. GenitalChlamydiaPrevalenceinEuropeand Non-EuropeanHighIncomeCountries: SystematicReviewandMeta-Analysis. Plos One. 2015.

Robial R. Frequencia de chlamydia trachomatis e a sua associação com a expressão de p16/ki-67 em mulheres com lesões intraepiteliais cervicais.. Dissertação de mestrado. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2015.

Rodes B, Liu H, Johnson S, George R, Sterner B. Molecular cloning of a gene (polA) coding for an unusual DNA polymerase I from Treponema pallidum. J. Med Microbiol. 2000;49:657-67.

Rossetti ML, Da Silva CMD, Rodrigues JJS. Doenças Infecciosas - Diagnostico Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara - Koogan; 2006.

Rota O. Diagnsotico Sorologico da Sífilis. Anais Bras Dermatol. 2005.

Rubial MDPV, Neto JSF. Avaliação de diferentes protocolos de extração de DNA para detecção de Brucella abortus a partir de diferentes tecidos de vacas infectads experimentalmente com a cepa 2308. Dissetação de Mestrado. São Paulo: USP - Universidade de São Paulo; 2009.

Saúde MD. Paagina acessada em 15/08/17. www.mdsaude.com/2009/01/exame-teste-sorologia-hiv-aids-sida.html .

Saúde Md. Boletim Epidemiológico - HIV-AIDS. Secretaria de Vigilancia em Saúde; 2016.

Saúde Md. Manual Tecnico para o Diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasilia

2014.

Saúde Md. Manual tecnico para o diagnóstico da infecção pelo HIV. Brasília: Secretaria de Vigilancia em Saúde; 2014.

Scheers S, Chu PL, Klausner JD, al e. Effect of highly active antiretroviral therapy an diagnoses of sexually transmitted diseases in people with AIDS. Lancet. 2001;357:432-35.

Seadi CF, Oravea R, Poser BV, Contarelli VV, Rossetti ML. Diagnsotico Laboratorial de infecção pela Chlamydia trachomatis: vantagens e desvantagens. J BrasPatol Med Lab. 2002;38(2):125-33.

Shelds M, Guy RJ, Jeofeys NJ, Finlayson RJ, Donavon B. A Longitudinal evaluation of Treponema pallidum PCR testing in early syphilis. BMC Infect Dis. 2012;12:353-58.

Silva LCFd. Doencas Sexualmente transmissíveis em mulheres infectadas por HIV ou portadoras de AIDS, atendidas em serviço de assistencia especializada em HIV/AIDS do Amazonas: Infecção por Clamídia trachomatis, Trichomonas vaginalis e Papilomavirus Humano. Tese de Doutorado do programa de pos graduação em medicina tropical da Universidade do Estado do Amazonas. Manaus 2014.

Silva GRd, Inigues AM. Analise palenteologica de trepanematoses em remanecentes humanos do periodo historico (Seculo XVII a XIX). Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Publica (ENSP-FIOCRUZ); 2014.

Silva LCFd, Miranda AE, Batalha RS, Sabino. Carolina, Dib, Elizabeth Cristina Dantas, Costa, Carolina Marinho da, Ramasawmy, Rajandranath, Talhari, Sinésio. Chlamydia trachomatis infection among HIV-inected women attendingan AIDS clinic in the city of Manaus - Brazil. Braz J Infect dis.

2012;16(4):335-38.

Silveira MFd, Sclowitz IKT, Entiauspe LG, Mesenburg MA, Stcuffert D, Bicca GLdO, Pienez C, Manta AB. Chlamydia trachomatis infection in young pregnant women in Southern Brazil: a cross-sectional study. *Cad, Saúde Publica*. 2017;33(1):1-9.

Siqueira CS, Silveria FRX. Diagnóstico da sífilis em lesões orais, Estudo corporativo utilizando-se as técnicas Histoquímicas e imunohistoquímicas. Tese de Doutorado. São Paulo: USP; 2012.

Somani J, Bhullar VB, Workowski KA, Farshy CE, Black CM. Multiple Drug-resistant Chlamydia trachomatis associated with clinical treatment failure. *J infect Dis*. 2000;181(4):1421-7.

Sun X, Ellerbrock TV, LUNGU O, et al. Human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-seropositive women. *Obstet Gynecol*. 1995;85(5 pt 1):680-6.

Sun X, Kuhn L, Ellerbrock TV, Chiasson MA et al. Human papillomavirus infection in women infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 1997;33(7):1343-49.

Tadesse E, Teshome M, Amsalu A, Shimelis T. Genital Chlamydia trachomatis infection among women of reproductive age attending the gynecology clinic of Hawassa university referral hospital, southern Ethiopia. *PLOS-ONE*. 2016;22:1-11.

Tornesello ML, Duraturo ML, Giorgi-Rossi P et al. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants in human immunodeficiency virus-positive Italian women. *J Gen Virol*. 2008;121(1):32-42.

Torres RJ, Garcia MG, Puig JG. Carrier and prenatal diagnosis of Lesch-Nyhan

disease due to a defect in HPRT gene expression regulation. *Gene*. 2012;511:306-07.

Travassos ACA, Britus C, M.Netto E, Fernandes SdA, Rutherford GW, Queiroz CM. Prevalence of sexually transmitted infections among HIV-infected women in Brazil. *The Brazilians J Infect Dis*. 2012;16(6):581-85.

Valladão AS, Costa CMdS, Camargo JAd, Soares VCG. Chlamydia trachomatis e suas implicações na reprodução humana. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(4):457-62.

Varella RdQ, Passos MRL, Pinheiro VMS, Lopes HR, Santana SB, Guimaraes CC, DeAngeles F. Pesquisa de Chlamydia trachomatis em mulheres do município de Piraí - Rio de Janeiro. *J. Bras Doencas Sex Transmn*. 2000;12:27-44.

Vaz LP. Detecção e genotipagem do papilomavirus humano (HPV) em mulheres HIV positivas e em controle de Goiania - GO. Dissertação de Mestrado do programa de Mestrado em Genética da Universidade Católica de Goiás. Goiania 2009.

Vega NC, Otero RM, Garcia S, Diaz JL, Noriega ER, Ortiz AC, Castellanos MMA, Olazaran SM, Trevino SF, Marfin SP, et al. Sexually transmitted pathogens, coinfections and risk factors in patients attending obstetrics and gynecology clinics in Jalisco, Mexico. *salud pública méx*. 2016;58 (4):437-445.

Verza M, Maschmann RdA, Silva MSN, Costa ERD, Ribeiro MO, Rosso F, Suffys PN, Marcelli F, Zaha A, Rossetti MLR. In House colorimetric reverse hibridisation assay for detection of the mutation mast frequently associated with resistance to aisonated in Micobacterium tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(5):710-14.

WHO. Global prevalence and incidence of seleted curable sexually transmitted

infections - Overview and estimates: 2008. Geneva: World Health organization; 2012.

WHO. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections. Overview and Estimates, 1999. Geneva: World Health Organization; 2001.

Wohlmeister D, Vianna DRB, Helfer VE, Gimenes F, Consolaro MEL, Barcellos RB, Rossetti ML, Calil LN, Buffon A, Pilger DA. Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2016;111(2):106-12.

Zhou L, Gong R, Lu X, Zang Y, Tang JF. Development of a multiplex Real Time PCR assay for the detection of Treponema pallidum, HCV, HIV-1 and HBV. J. Microbiol. 2015;68:481-87.

Zhu Y, Yin B, Wo T, Ye L, Chen C, Zeng Y, Zhang Y. Comparative study in infertile couples with and without Chlamydia trachomatis genital infection. Bio Med Central. 2017;14(5):1-9.