

Validação do método de detecção de *Chlamydia trachomatis* por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real*

Validation of a *Chlamydia trachomatis* detection method by Real Time Polymerase Chain Reaction

Lilian de Assis Poiares^{1,2}, Fabiano Sandrini^{1,2}, Paulo de Sá Osório^{1,2}, Álvaro Largura^{1,2} & Rita de Cássia Garcia Simão³

RESUMO - Infecções causadas por *Chlamydia trachomatis* são recentemente reconhecidas como as mais prevalentes e estão entre as mais prejudiciais doenças sexualmente transmissíveis (DST) no mundo. A ausência de sintomas dificulta o diagnóstico clínico das infecções clamidiais. Um dos desafios na prevenção das infecções causadas por *C. trachomatis* é a disponibilidade de diagnósticos laboratoriais com alta sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. No presente estudo, foi comparado o desempenho do testes de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) COBAS Amplicor® *Chlamydia trachomatis* (Roche) e PCR em tempo real (SYBR® - Green), usados para detecção de *Chlamydia trachomatis* em espécimes de urina e secreções urogenitais. O COBAS Amplicor® (Roche) é um teste de PCR convencional e foi usado como ferramenta para controle e teste de padrão ouro para diagnóstico no presente trabalho. Um total de 136 amostras de secreção endocervical (61), secreção uretral (14) e urina (61), foram obtidas de pacientes submetidos a testes de detecção de *Chlamydia trachomatis* no Laboratório Alvaro S/A. Os métodos de PCR em tempo real e COBAS Amplicor® (Roche) foram igualmente sensíveis para o diagnóstico de *C. trachomatis* em amostras de secreção uretral. Entretanto, em análises de urina e secreção endocervical o teste COBAS Amplicor® (Roche) mostrou 57% e 33% de positividade, respectivamente, contra 47% e 24% de positividade obtidos para as mesmas amostras usando a PCR em tempo real. A maior sensibilidade (100%) obtida usando-se o ensaio de PCR em tempo real, foi em análises das amostras de secreção endocervical. A PCR em tempo real, comparada com o teste padrão ouro, mostrou uma alta especificidade (100%) e um valor preditivo positivo de 100% para as diferentes amostras clínicas estudadas. Em conclusão, os dados apresentados neste estudo indicam que a PCR em tempo real mostrou um alto desempenho para detecção de *C. trachomatis* em diferentes espécimes clínicos. Além disso, este método pode ser usado como uma poderosa ferramenta no diagnóstico e investigação epidemiológica de infecções associadas com *C. trachomatis*.

PALAVRAS-CHAVE - *Chlamydia trachomatis*, PCR, diagnóstico

SUMMARY - Infections caused by *Chlamydia trachomatis* are now recognized as the most prevalent and are among the most damaging of all sexually transmitted diseases (STD) worldwide. Lack of symptoms makes clinical diagnosis of chlamydial infection difficult. One of the challenge in the prevention of *C. trachomatis* infections is the availability of laboratory diagnostics with high sensitivity, specificity and reliable. In the present study, the performance of conventional polymerase chain reaction (PCR) and Real-time PCR (SYBR® -Green) tests used for detection of *Chlamydia trachomatis* in urine and urogenital specimens were compared. The COBAS Amplicor® (Roche) is a conventional PCR and was used as a tool of control and gold standard test for diagnosis in this work. A total of 136 samples of endocervical secretion (61), urethral secretion (14) and urine (61), were obtained from patients submitted of *Chlamydia trachomatis* detection tests of Laboratório Alvaro S/A. Real-time PCR (SYBR® -Green) and COBAS Amplicor® *Chlamydia trachomatis* Test (Roche) methods were equally sensitivity for diagnostic of *C. trachomatis* in urethral secretion samples. However, in analyses of the urine and endocervical secretion samples the COBAS Amplicor® test displayed 57% and 33% of positivity, respectively, against 47% and 24% of positivity obtained for the same samples using Real-time PCR. The highest sensibility (100%) using Real-time PCR assay was obtained in analyses of endocervical secretion samples. Real-time PCR, comparing with our gold standard showed a high specificity (100%) and a positive predictive value of 100% for different clinical samples studied. In conclusion, the data presented in this study indicate that PCR - Real time have shown a high performance for detection of *C. trachomatis* in different clinical specimens. Moreover, this method can be used as a powerful tool in diagnostic and epidemiological investigation of infection associated with *C. trachomatis*.

KEYWORDS - *Chlamydia trachomatis*, PCR, diagnosis

INTRODUÇÃO

A disseminação das infecções de transmissão sexual vem assumindo importância crescente. A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram aproximadamente 250 milhões de casos novos a cada ano. Dentre estes, as infecções por *Chlamydia trachomatis* têm sido cada vez mais reconhecidas e prevalentes em pacientes de ambos os sexos. Estas infecções já superam as doenças sexualmente transmissíveis (DST) clássicas tais como a sífilis e gonorréia, transformando-se em um sério problema de saúde pública^{14,19,27}. Não há dados epidemiológicos de infecções específicas por *C. trachomatis* no Brasil. Dados dos Estados Unidos sugerem que a infecção por esse patógeno é a mais comum DST, com uma estimativa de 4,5 milhões de casos ao ano^{18,19,24, 26}. Os estudos epidemiológicos publicados têm demonstrado

uma prevalência substancial em adultos e jovens sexualmente ativos e relatam taxas de prevalência de 5 a 20% entre mulheres que freqüentam clínicas de planejamento familiar; 20 a 40% em mulheres e garotas adolescentes, sexualmente ativas, que freqüentam clínicas de DST e 25% de todas as mulheres atendidas em clínicas ginecológicas. Cerca de 8% das mulheres jovens são assintomáticas e 3 a 5% dos homens também não apresentam sintomas genitourinários embora sejam portadores de *C. trachomatis*³. Além do fato desta bactéria ser considerada o mais comum microrganismo sexualmente transmissível em todo o mundo, é também a principal causa de infertilidade em mulheres. Isto tem preocupado especialistas da área da saúde, principalmente pelo fato de alguns pacientes apresentarem sintomas brandos ou ausentes da infecção causada por *C. trachomatis*^{7,8,11,12}. Este microrganismo causa ainda uma

Recebido em 30/05/2007

Aprovado em 27/02/2008

*Laboratório Alvaro

¹Laboratório Alvaro

³Instituto de Investigação Científica do Paraná, Cascavel - Paraná.

²Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus de Cascavel, PR.

série de síndromes clínicas em homens e em mulheres²⁴, sendo a causa mais comum de uretrites e cervicites, incluindo sérias seqüelas como doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade, gravidez ectópica e epididimites^{6,18}.

A família *Chlamydiaceae* é constituída de um gênero denominado *Chlamydia*, que apresenta três espécies patogênicas ao homem, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* e *Chlamydia psittaci*. *C. trachomatis* é o agente causador do tracoma que pode levar a cegueira na espécie humana, causa a uretrite não-gonocócica e o linfogranuloma venéreo (LGV), outra DST. *C. pneumoniae* e *C. psittaci* são agentes etiológicos de grande parte das infecções respiratórias²⁵.

C. trachomatis são bactérias do tipo cocos Gram-negativos que variam de 0,2 a 1,5 µm de tamanho^{14,20,25} e atuam como parasitas intracelulares obrigatórios de células eucarióticas, sendo incapazes de sintetizar ATP. Infectam somente células humanas e são usualmente transmitidas via contato sexual³. Bactérias do gênero *Chlamydia* possuem um ciclo de desenvolvimento peculiar caracterizado pela replicação dentro do citoplasma da célula hospedeira. Durante este ciclo de vida bifásico ocorre a formação de duas estruturas bem distintas: os corpos elementares (CE) e os corpos reticulares (CR). Os CE são adaptados à sobrevivência extracelular e a iniciar o processo de infecção. Após a adesão à célula eucariótica, os CE entram na célula por endocitose e permanecem em vacúolos intracelulares denominados corpos de inclusão. Em seguida, os CE mudam para uma forma metabolicamente ativa originando os CR, os quais estão adaptados à multiplicação intracelular^{14,20,25}.

As manifestações clínicas das infecções por *C. trachomatis* são produzidas em seqüência da destruição direta das células durante a multiplicação bacteriana intracelular e da resposta inflamatória do hospedeiro¹⁴. Apesar de *C. trachomatis* ser antigenicamente complexa, a bactéria expressa dois antígenos que estão relacionados ao diagnóstico e à patogênese, um lipopolissacarídeo de superfície (LPS) e a proteína de membrana externa MOMP ("Major Outer Membrane Protein")²⁰. Variantes sorológicas com base no LPS são encontradas para *C. trachomatis*, de modo que os sorotipos A-C colonizam preferencialmente os olhos e causam o tracoma, sorotipos D-K colonizam o trato genital e causam infecções genitais e os sorotipos L1-L3 causam o linfogranuloma venéreo (LGV)²¹. Assim como os lipopolissacarídeos, a proteína MOMP codificada pelo gene *omp1*, está presente em todas as espécies patogênicas de *Chlamydia*. MOMP é muito usada para determinação genotípica de *C. trachomatis*, o gene *omp1* apresenta cinco regiões conservadas e quatro variáveis (VDI e VDIV) que diferem consideravelmente entre as espécies de *Chlamydia*^{22, 28}.

C. trachomatis, através de seus sorotipos, pode causar doenças em adultos, crianças e neonatos de ambos os sexos, sendo os quadros clínicos superficiais ou profundos, promovendo algumas vezes seqüelas graves e irreversíveis²⁵.

Vários métodos estão disponíveis para a detecção de *C. trachomatis* em amostras de material biológico através de exame direto (Giensa), cultura de células, imunofluorescência direta, métodos imunoenzimáticos e os métodos de amplificação de ácidos nucléicos. A partir de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucléicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecção por bactérias do gênero *Chlamydia* em função da rapidez e sensibilidade e por não depender da viabilidade da amostra^{3,6,20,27}.

A grande vantagem de técnicas de amplificação do DNA é a sensibilidade (98% a 99% em relação aos demais métodos) e a possibilidade de se utilizar urina para a detecção de DNA de clamídia¹. O teste COBAS – Amplicor *Chlamy-*

dia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) test (Roche Diagnostic Systems) é um teste qualitativo *in vitro* para detecção de *C. trachomatis* em urina de indivíduos de ambos os sexos e em amostras de secreção endocervical e uretral. Este teste consiste de um ensaio multiplex que permite a amplificação simultânea de DNA alvo de *C. trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*, além de um controle interno. Para a identificação de *C. trachomatis* o teste baseia-se na amplificação de ácidos nucléicos por Reação em Cadeia da Polimerase usando oligonucleotídeos biotinizados, hibridização de ácidos nucléicos amplificados com sondas oligonucleotídicas específicas dos alvos e detecção dos produtos amplificados e fixos à sonda por determinação colorimétrica¹. A seqüência alvo que é amplificada corresponde a 207 pb de parte do gene de virulência que codifica uma Integrase e está presente em um plasmídeo críptico que tem 7,8 kb e ocorre em aproximadamente 10 cópias por célula da bactéria *C. trachomatis*. A identificação de um alvo plasmidial aumenta a sensibilidade do método comparado com o uso de alvos cromossômicos de cópia única, como por exemplo o gene *omp1*¹³.

As infecções causadas por *C. trachomatis* são freqüentes, assintomáticas e com complicações relacionadas com infertilidade em um grande número de casos. Os métodos de detecção mais utilizados são complexos e laboriosos. A aplicação e validação de métodos moleculares favorecem o diagnóstico rápido e preciso. O objetivo deste trabalho foi validar o método de PCR – em tempo real para o diagnóstico de *C. trachomatis* em amostras de urina e secreção endocervical e uretral, usando o método de PCR COBAS – Amplicor® *Chlamydia trachomatis* test (Roche Diagnostic Systems) como ferramenta de controle e comparação nos experimentos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras clínicas

Foram utilizadas 136 amostras obtidas de pacientes submetidos a exame de detecção de *Chlamydia trachomatis* no Laboratório Álvaro S/A. Estas amostras foram oriundas de secreção endocervical, secreção uretral e urina. Swabs endocervical e uretral foram coletados em kits fornecidos pelo Laboratório Álvaro com meio de transporte apropriado para *Chlamydia trachomatis* (tampão), as urinas foram coletadas em frascos estéreis, urina de primeiro jato. As amostras foram armazenadas a temperatura de 2 - 8°C e os exames foram realizados em intervalo máximo de 48h.

PCR

A PCR foi realizada usando o kit de diagnóstico COBAS – Amplicor *Chlamydia trachomatis* test (Roche Diagnostic Systems) utilizando a amostra de acordo com as instruções do fabricante. Para amostras endocervical e uretral, foi adicionado 1 mL do diluente (tampão Tris-HCL, 6Mm de Cloreto de Magnésio, detergente e azida sódica), os tubos foram misturados e agitados em vortex, em seguida incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, 50 mL da amostra foi adicionado a cada tubo de PCR que contem 50 ml da mistura para *Chlamydia*. Essa mistura contém oligonucleotídeos biotinizados (ct-cp24: GGATTCCTGTAAACAACAAGTCAGG e ct-cp27: CCTCTTCCCCAGAACAATAAGAACAC) que amplificam uma seqüência plasmidial de 207 pb de *C. trachomatis*. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 2400 Applied Biosystems. Após a amplificação, as misturas de PCR foram desnaturadas com uma

solução de hidróxido de sódio e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida 25 mL da mistura foi adicionada a uma microplaca revestida com sondas oligonucleotídicas específicas para *C. trachomatis* conjugadas a biotina. Após 1h de incubação a 37°C, as placas foram lavadas para remover as sondas não aderidas e uma solução Avidina - Peroxidase de Rábano Silvestre foi adicionada. Depois a placa foi incubada por 15 minutos a 37°C, e lavada. O conjugado Avidina - Peroxidase se fixa ao amplicom marcado com biotina que foi hibridizado pelas sondas oligonucleotídicas que se encontram fixas à placa. A placa é lavada novamente para remover o conjugado não fixo e uma solução de substrato contendo peróxido de hidrogênio e 3,3',5,5' - tetrametilbenzina (TMB) é adicionada aos reservatórios. A peroxidase de rabano silvestre catalisa a oxidação de TMB em um composto colorido. A reação é interrompida pela adição de um ácido fraco, sendo determinada a absorbância em $\lambda=450$ nm através de um leitor automatizado para microplacas (Leitor Bio-Tek, modelo ELx800).

PCR em tempo real

As amostras foram submetidas à extração de DNA total usando o kit comercial Qiagen (QIAamp[®] DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook) seguindo as recomendações do fabricante

Na técnica de amplificação de ácidos nucleicos em tempo real foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ct-cp24 e ct-cp27, ou seja, os mesmos aplicados com o Kit de diagnóstico COBAS - Amplicor(*Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* (CT/NG) test (Roche Diagnostic Systems). A reação de PCR foi executada em um volume total de 25 μ l, a mistura contém 5 μ l de DNA, 12,5 μ l de SYBR Green I (Taq- polimerase, tampão, dNTP's e o corante SYBR Green; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany), 0,5 μ l de cada primer e 6,5 μ l de água deionizada. A amplificação e a detecção do material foi feita em termociclador Real Time Applied Biosystems usando o seguinte programa, 95° C por 5 minutos, seguida de 49 ciclos (95°C por 30 segundos, 60° C por 1 minuto) e 72° C por 10 minutos. Os produtos obtidos foram também analisados em eletroforese com gel de agarose a 2%. Os resultados da análise foram comparados com o Kit de diagnóstico COBAS - Amplicor(*Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae* (CT/NG) test (Roche Diagnostic Systems (Roche).

RESULTADOS

A infecção por *Chlamydia trachomatis* é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns em todo o mundo. As infecções podem afetar os olhos, os pulmões, ou a área urogenital, dependendo da idade da pessoa infectada e como a infecção é transmitida. As secreções endocervical e uretral e a urina podem facilmente ser selecionados para detecção de *C. trachomatis*. Os testes de amplificação dos ácidos nucleicos são considerados atualmente como os métodos mais sensíveis para detecção do patógeno.

Foram analisadas e comparadas 136 amostras para a detecção de *C. trachomatis*. Deste grupo, 61 swabs de secreção endocervical, 14 de secreção uretral, e 61 amostras de urina. Neste trabalho foram consideradas verdadeiramente positivas (VP) ou verdadeiramente negativas (VN) as amostras identificadas com o teste de diagnóstico COBAS - Amplicor(Roche), usado como padrão ouro. A PCR em tempo real e o teste COBAS - Amplicor(Roche) foram igualmente sensíveis para diagnóstico de *C. trachomatis* em amostras de secreção uretral (Tabela 1). Entretanto, em amostras de

urina e secreção endocervical o teste COBAS - Amplicor(Roche) mostrou 57% e 33% de positividade, respectivamente, contra 47% e 24% de positividade, obtidos para as mesmas amostras com a PCR em tempo real (Tabela 1).

Diagnósticos de *C. trachomatis* a partir de amostras de urina e secreção têm sido comparados por diferentes autores, e demonstram que a sensibilidade de identificação de *C. trachomatis* por PCR em tempo real em amostras endocervicais é ligeiramente maior do que aquela obtida em amostras de urina^{23,7}. Neste trabalho nós mostramos que o teste em validação apresentou uma sensibilidade de 85% para amostras de urina, 80% para amostras de secreção endocervical e 100% para amostra de secreção uretral, comparando com o nosso padrão ouro, mostrando que a sensibilidade alcançada com o método é uma sensibilidade apropriada para fins diagnósticos (Tabela 2) já que a sensibilidade dos testes considerados de não amplificação de ácidos nucleicos (cultura de células, imunofluorescência direta, métodos imunoenzimáticos e exame direto) é menor¹⁰. A característica comum entre os testes de amplificação de ácidos nucleicos é que este está projetado para amplificar as seqüências dos ácidos nucleicos que são específicas para o organismo que está sendo detectado. Diferente dos outros métodos diagnósticos presentes na rotina clínica, os testes de amplificação não requerem organismos viáveis. A sensibilidade aumentada desses testes é atribuída a sua habilidade de produzir um sinal de amplificação mínimo a partir de uma única cópia do DNA do alvo ou do RNA¹⁰. Verifica-se também uma especificidade de 100% em um valor preditivo positivo de 100% para os diferentes materiais clínicos estudados (Tabela 2).

TABELA I

Percentagem de amostras positivas e negativas de acordo com o método utilizado e a espécie clínica.

Amostra	COBAS Amplicor [®] Roche		PCR em tempo real		Total de amostras
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas	
Urina	35 (57%)	26 (43%)	29 (47%)	32 (53%)	61 amostras
Secreção Endocervical	20 (33%)	41 (67%)	15 (24%)	46 (76%)	61 amostras
Secreção uretral	7 (50%)	7 (50%)	7 (50%)	7 (50%)	14 amostras

TABELA II

Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo do PCR em Tempo Real.

Método utilizado	Tipo de amostra	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor Preditivo Positivo	Valor Preditivo Negativo
PCR em tempo real	Urina	85%	100%	100%	81%
	Secreção endocervical	80%	100%	100%	89%
	Secreção uretral	100%	100%	100%	100%

DISCUSSÃO

A maior dificuldade no diagnóstico da infecção por *Chlamydia trachomatis* é o caráter assintomático desta. A escolha da PCR na detecção de *C. trachomatis* em amostras clínicas está fundamentada na maior sensibilidade e especificidade de métodos de biologia molecular frente aos métodos de imunodeteção². Comparados ao isolamento do

patógeno em cultivo celular, os métodos moleculares são mais rápidos, apresentam maior sensibilidade e especificidade¹⁰, além de não exigirem cuidados de armazenamento para conservar a viabilidade das amostras³.

A amplificação de DNA, na detecção de *C. trachomatis* é o método de eleição por sua maior sensibilidade⁹, especialmente quando dirigida ao plasmídeo críptico da bactéria presente em 7 a 10 cópias por célula¹³. A vantagem da PCR em tempo real em relação a PCR COBAS Amplicor® que é qualitativa, é a facilidade de quantificação, maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade no processo e menor risco de contaminação¹⁵. No presente trabalho nós obtivemos menor sensibilidade do método de PCR em tempo real para identificação de *C. trachomatis* nas amostras de secreção endocervical e urina. Isto poderia estar relacionado ao maior número de passos pré-analíticos utilizados na análise. Já que o teste COBAS - Amplicor® (Roche) é padronizado para análise de material clínico direto, na PCR em tempo real as amostras de DNA plasmidial foram extraídas usando um kit de extração de DNA total (Qiagen). A utilização de um kit de extração de DNA plasmidial seria mais recomendada neste caso, seguida de análise por PCR em tempo real. Entretanto, dados da literatura mostram que variantes livres do plasmídeo de *C. trachomatis* podem ser encontradas em amostras clínicas e estas não podem ser detectadas se apenas o DNA plasmidial bacteriano for usado para amplificação do DNA alvo³. Assim, para eliminarmos possibilidades de resultados falsos negativos utilizamos um método de extração de DNA total das amostras clínicas.

Uma outra vantagem a ser destacada, é a habilidade dos testes de amplificação de ácidos nucleicos de detectar *C. trachomatis* em amostras de fácil coleta, como a urina, eliminando a necessidade de técnicas invasivas para a obtenção do material clínico. Uma desvantagem desta técnica é que as amostras podem conter inibidores da amplificação levando a obtenção dos resultados falso-negativos. Assim, a padronização da metodologia e o uso de controles são indispensáveis ao processo.

Na validação do método de PCR em tempo real para *C. trachomatis*, obtivemos 85% de sensibilidade e 100% de especificidade quando comparada com o PCR COBAS - Amplicor® (Roche) sugerindo que ambas as técnicas são altamente eficazes e confiáveis para diagnosticar esse patógeno, podendo oferecer a clínicos uma indicação mais clara para o tratamento da infecção.

REFERÊNCIAS

1. AMPLICOR Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae (CT/NG) Test (Roche). Roche Molecular Systems, 2003.
2. An Q, Radcliffe G, Vassallo R, Buxton D, O'Brien WJ, Pelletier DA, Weisburg WG, Klinger JD, Olive DM. Infection with a plasmid-free variant Chlamydia related to Chlamydia trachomatis identified by using multiple assays for nucleic acid detection. J Clin Microbiol. 1992, 30 (11):2814-2821.
3. Black, Carolyn M. Current Methods of Laboratory Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections. Clin. Microbiol. Rev., 10(1): 160-184, 1997. (12)
4. Boel, C. H. E. et al. Evaluation of Conventional and Real-Time PCR Assays Using Two Targets for Confirmation of Results of the COBAS AMPLICOR Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae Test for Detection of Neisseria gonorrhoeae in Clinical Samples. J. Clin. Microbiol., 43(5): 2231-2235, 2005. (4)
5. Chan EL; Brandt K; Stoneham H; Antonishyn N; Horsman GB (2000). Comparison of the effectiveness of polymerase chain reaction and enzyme immunoassay in detecting Chlamydia trachomatis in different female genitourinary specimens. Archives of pathology & laboratory medicine; Vol. 124 (6); 840-3.
6. Chan, E. L. Laboratory testing for Chlamydia trachomatis urogenital infections. The Journal of Family Planning and Reproductive Health Care 2002; 28 (3): 153-154.
7. Cook, R. L. et al. Systematic Review: Noninvasive Testing for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Annals of Internal Medicine, 142(11): 914-924, 2005. (7)
8. Eickhoff, M. et al. Ultra-Rapid Detection of Chlamydia trachomatis by Real-Time PCR in the LightCyclerR using SYBR Green Technology or 5'-Nuclease Probes. ClinLab 2003; 49: 217-225 (8)
9. Johnson Re, Green Ta, Schachter J, Jones Rb, Hook Ew, Black Cm, Martin Dh, St Louis Me, Stamm We. Evaluation of nucleic acid amplification tests as reference tests for Chlamydia trachomatis infections in asymptomatic men. J. Clin. Microbiol., 38: 4382-4386, 2000.
10. Johnson Re, Newhall Jw, Papp Jr, Knapp Js, Black Cm, Gift Tl, Steece R, Markowitz Lf, Devineo J, Walsh Cm, Gunter Dc, Irwin Kl, Lisle S, Berman Sm. Screening tests to detect Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae infections. MMWR 2002, 51(No.RR-15): 1-38.
11. Johnson, S. J. et al. Semiautomation of Nucleic Acid-based Assays for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Clin Chem 2001 47: 760-763. (6)
12. Keegan et al. Validation of a Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection of Human Papillomavirus and Chlamydia trachomatis in Cervical PreservCyt Samples. Clin Chem.2005; 51: 1301-1302. (3)
13. Mahony JB, Luinstra KE, Sellors JW, Chernesky MA. Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assay for detecting Chlamydia trachomatis nucleic acids. J Clin Microbiol 1993, 31: 1753-1758).
14. Murray, P. R. et al. Microbiologia Médica, 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 302-308.
15. Novais CM, Pires-Alves M & Silva FF. PCR em tempo real. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 2004, 33:10-13.
16. Persing Dh. Target selection and optimization of amplification reactions. In: Diagnostics molecular microbiology principles and applications. ASM, Washington, p.88-104, 1993.
17. Pourahmadia, F. et al. Toward a Rapid, Integrated, and Fully Automated DNA Diagnostic Assay for Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae. Clinical Chemistry 46: 1511-1513, 2000; (9)
18. Quinn, T. C. et al. Diagnosis by AMPLICOR PCR of Chlamydia trachomatis Infection in Urine Samples from Women and Men Attending Sexually Transmitted Disease Clinics. J. Clin. Microbiol., 34(6): 1401-1406, 1996. (1)
19. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of Chlamydia trachomatis in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2003. (10)
20. Seadi, C. F. et al. Diagnóstico laboratorial da infecção pela Chlamydia trachomatis: vantagens e desvantagens das técnicas. J. Brás. Patol. Méd. Lab. Vol. 38 no 2, 2002.
21. Schachter J, Stamm W E. In: Murray PR, editors Manual of Clinical of Microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC, USA 1999: 795-806).
22. Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. Diversity of Chlamydia trachomatis major outer membrane protein genes. Journal of Bacteriology, 1987; 169:3879-3885
23. Sugunendran H; Birley HD; Mallinson H; Abbott M; Tong CY (2001) Comparison of urine, first and second endourethral swabs for PCR based detection of genital Chlamydia trachomatis infection in male patients. Sexually transmitted infections; Vol. 77 (6); 423-6
24. Tan, H. H, Chan, R. Use of polymerase chain reaction on pooled cervical swabs to detect Chlamydia trachomatis infections in female sex workers in Singapore. Singapore Med. J. 2005; 46(5):215. (11)
25. Tortora, G. J. et al. Microbiologia, 6ª ed. São Paulo: Artmed, 2000, 575-700.
26. Toye, B. et al. Diagnosis of Chlamydia trachomatis Infections in Asymptomatic Men and Woman by PCR Assay. Clin. Microbiol. Rev., 34(6): 1396-1400, 1996. (2)
27. Veronesi, R. Focaccia, R. Tratado de Infectologia, 2ª ed. Atheneu, 2002, 561-569.
28. Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, Caldwell HD. Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 Chlamydia trachomatis serovars. Infect Immun 1989; 1040-1049)

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Dra. Lilian de Assis Poiars
Rua General Osório, 3212
CEP. 85801-110 - Cascavel - PR