

UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Curso de Biomedicina

Estella Moraes Felix

**PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DE GONORRÉIA PELA TÉCNICA DE PCR EM
TEMPO REAL**

**São Paulo
2021**

Estella Moraes Felix

**PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DE GONORRÉIA PELA TÉCNICA DE PCR EM
TEMPO REAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Santo Amaro – UNISA, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Tiemi Shio

**São Paulo
2021**

F36p Felix, Estella Moraes

Padronização do diagnóstico molecular de gonorreia pelo método de RTPCR
/ Estella Moraes Felix. – São Paulo, 2021.

33 f.: il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) –
Universidade Santo Amaro, 2021.

Orientador(a): Prof^a Ma. Marina Tiemi Shio

1. Diagnóstico molecular. 2. Neisseria gonorrhoeae 3. PCR. I. Shio, Marina
Tiemi, orient. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

Elaborado por Maria Lucélia S Miranda – CRB 8 / 7177

Estella Moraes Felix

**PADRONIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DE GONORRÉIA PELA TÉCNICA DE PCR EM
TEMPO REAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Biomedicina da
Universidade Santo Amaro – UNISA, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Tiemi Shio

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marina Tiemi Shio

Prof. Dr. Luiz Henrique da Silva Nali

Profa.Dra. Carolina Nunes França

Conceito Final: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada família, que sempre esteve comigo, e a todas as pessoas que, de algum modo, fizeram parte desta minha batalha até aqui.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, aos meus pais Lucilene e Carlos Henrique por todo apoio, atenção, carinho, conselhos, broncas e principalmente amor que me dão. Eles são duas pessoas batalhadoras abençoadas por Deus que me inspiram a ser uma pessoa melhor para o mundo. Agradeço com o coração transbordando de amor por sempre batalharem e darem o melhor para mim, sem os dois eu não estaria aqui hoje. Obrigada mãe e pai! Eu amo demais vocês e minha meta é não parar de dar orgulho para a nossa família! Também quero agradecer a minha irmã Estefany que sempre me anima, escuta e está comigo em todas as situações com seu jeito incrível que só quem conhece sabe. Ela tem uma parte grande nesta minha trajetória e não podia faltar em dizer que amo mais que tudo e vou estar sempre aqui por você.

Aproveitando para agradecer o meu namorado Lucas por estar sempre comigo me fazendo feliz e esquecendo dos problemas, me incentivando sempre para fazer o meu melhor e sendo o meu porto seguro, ele faz a diferença na minha vida e o quanto o amo não dá para explicar, agradeço por ser ele ao meu lado! Obrigada também a cada um da minha família, que de algum modo me ajudou me incentivou e esteve comigo nesta fase.

As minhas amigas da faculdade que vou levar para vida Barbara, Bianca, Danielle, Gabriela Felix, Gabriela Viana, Giulia, Marissa, Nayara e Steffany sem elas isso também não seria possível, obrigada por cada momento juntas todas são incríveis, me orgulho muito da amizade que construímos e cada uma tem um espaço em meu coração.

Agradecer também todos os meus amigos e amigas que estão em minha vida, cada um tem um espaço importante nessa minha caminhada.

E, por fim, agradecer uma pessoa especial e incrível como profissional e ser humano que me ajudou, ensinou, incentivou e acolheu nessa trajetória universitária, Marina Shio obrigada por toda a paciência comigo, os ensinamentos, as broncas, conselhos e risadas que tivemos nunca vou me esquecer da brilhante pessoa que é.

RESUMO

Entre as infecções sexualmente transmissíveis, destaca-se a gonorreia, uma infecção considerada pela Organização Mundial de Saúde como pandêmica e tendo como agente etiológico a bactéria *N. gonorrhoeae*, um diplococo Gram negativo, não flagelado, aeróbico, e portador de fímbrias que garantem maior aderência à superfície celular. Realizar a detecção dos portadores assintomáticos de gonorreia é um desafio permanente. Entre as estratégias propostas em literatura, está o rastreamento de infecções sexualmente transmissíveis (IST) em mulheres assintomáticas nos serviços que executam atendimento ginecológico, em especial os de planejamento familiar, de pré-natal e os serviços de prevenção do câncer cervical. O presente trabalho tem o objetivo de padronizar a técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR) baseada no sistema SYBR Green, para diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae* no laboratório de pesquisa da UNISA. Trata-se de um estudo experimental, quantitativo e laboratorial. Foi utilizada como amostra uma cultura de *N. gonorrhoeae*, desta foi extraído o DNA genômico e quantificado. O material extraído foi submetido PCR em tempo real, com sequências de iniciação (primers) pré-estabelecidas, seguida da análise de curva de desnaturação e curva de amplificação. A partir da execução do método, obteve-se como resultado um protocolo operacional padrão para diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae* no laboratório de pesquisa da UNISA. Os testes moleculares são mais sensíveis do que a cultura para o diagnóstico da gonorreia. No entanto, por ser um método de diagnóstico recente e ainda em padronização, sugere-se o desenvolvimento de maiores estudos que suportem sua padronização.

Palavras-chave: Diagnóstico molecular; *Neisseria gonorrhoeae*; PCR

ABSTRACT

Among sexually transmitted infections, gonorrhoea stands out, which is currently considered a pandemic by the World Health Organization. Causative agent of gonorrhoea, the bacterium *Neisseria gonorrhoeae*, an aerobic diplococcus gram-negative, non-flagellated and bearer of fimbriae that guarantees greater adhesion to the cell surface. Detecting asymptomatic carriers of gonorrhoea is an ongoing challenge. A proposal in the literature is the screening for sexually transmitted disorders (STIs) in asymptomatic women in services that provide gynecological care, especially family planning, prenatal care and cervical cancer prevention services. This work aims to standardize a real-time PCR or quantitative PCR (qPCR) technique based on the SYBR Green system, for the diagnosis of *N. gonorrhoeae* infection in the UNISA research laboratory. It is an experimental, quantitative and laboratory study. A culture of *N. gonorrhoeae* was used as a sample from which genomic DNA was extracted and quantified. The extracted material was subjected to real-time PCR, with pre-designed primers, followed by denaturation curve and amplification curve analysis. Upon execution of the method, a standard operating procedure for the diagnosis of *N. gonorrhoeae* infection in the UNISA research laboratory was obtained. Molecular tests are more sensitive than culture to diagnose gonorrhoea. However, as this is a recent diagnostic method and is still being standardized, further research is needed to support its standardization.

Keywords: Molecular diagnosis; *Neisseria gonorrhoeae*; PCR

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. JUSTIFICATIVA.....	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo geral	13
3.2 Objetivos específicos	13
4. MÉTODOS	14
4.3. Extração e quantificação de DNA.....	14
4.4 Seleção dos Primers.....	14
4.5 RT-qPCR.....	16
4.6 Obtenção da Curva de Desnaturação e da Curva de Amplificação.....	16
5. RESULTADOS.....	17
. DISCUSSÃO	20
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
8. REFERÊNCIAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

As infecções sexualmente transmissíveis (IST) são, por definição, doenças causadas por agentes infecciosos, vírus e bactérias, transmitidas pelo contato sexual oral, vaginal ou anal quando realizados sem o uso de preservativos. Entre estas, destaca-se a gonorreia, uma infecção considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como pandêmica e tendo como agente etiológico a bactéria *N. gonorrhoeae*, um diplococo Gram negativo, não flagelado, aeróbico, e portador de fímbrias que garantem maior aderência à superfície celular (BRASIL, 2015; OMS 2016).

Também chamada de blenorragia, pingadeira ou gota matinal. A gonorreia tem por característica clínica a presença abundante de corrimento viscoso e purulento pela uretra, tanto em homens como em mulheres. Sua importância a nível sanitário se dá pela alta incidência há décadas em todo o território nacional e internacional. Estimativas da OMS apontam para a incidência anual de 340 milhões de casos de gonorreia (HOCKENBERRY et al., 2016). No território brasileiro, atualmente, não estão disponíveis taxas consolidadas especificamente acerca dessa infecção, pois o Sistema Único de Saúde (SUS) notifica compulsoriamente apenas casos de HIV/AIDS, Sífilis congênita e Sífilis Gestacional, no entanto, estimativas apontadas pela Federação Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) baseadas em estudos envolvendo determinadas parcelas da população apontam para prevalências de média de 18%, o que certamente não reflete o cenário do território brasileiro (FEBRASGO, 2018; HOCKENBERRY et al., 2016).

Referente ao quadro clínico, apesar de grande parte dos acometidos serem assintomáticos, as manifestações clínicas desta patologia são didaticamente divididas em: infecção local assintomática e sintomática não complicada, infecção local complicada e infecção gonocócica disseminada. Na mulher, a endocervicite é o primeiro local da infecção gonocócica, muito embora a uretra esteja comprometida em 70 a 90% das infectadas. Nas mulheres sintomáticas, as manifestações clínicas surgem em média dez dias após o contágio. Os sintomas mais comuns são: corrimento vaginal, disúria, sangramento intermenstrual e dispareunia. Ao nível do colo uterino é frequente a presença de secreção mucopurulenta, eritema, friabilidade e ectopia. A nível de infecção crônica, as consequências em geral são cicatrizes

tubárias que podem causar infertilidade ou gravidez ectópica (LIMA et al., 2014; BARBOSA et al., 2010).

Realizar a detecção dos portadores assintomáticos de gonorreia é um desafio permanente. Entre as estratégias que o Ministério da Saúde propõe para suprir essa lacuna estão os rastreamentos de IST em mulheres assintomáticas nos serviços que executam atendimento ginecológico, em especial os de planejamento familiar, de pré-natal e os serviços de prevenção do câncer cervical. Aproveita-se a passagem da usuária em consulta de rotina para coleta de material ginecológico, que é encaminhado para detecção laboratorial da infecção gonocócica que identifica infecção por *N. gonorrhoeae* através do exame microscópico do material coletado da lesão em esfregaço corado pelo método de Gram ou pela cultura (BRASIL, 2015).

A citologia em base líquida é um método recente e foi introduzida na coleta de material ginecológico como uma alternativa à utilização do método convencional de esfregaço direto, com o propósito de melhora na especificidade e qualidade da amostra na lâmina. Consiste na realização de uma suspensão de células, através da imersão da escova coletora em um líquido conservante antes do processamento da amostra, abrindo a possibilidade de fazer outros testes que não apenas a leitura da lâmina no microscópio ótico na coloração de Papanicolaou, como o diagnóstico molecular, além de evitar problemas comuns no método convencional, como excesso de muco na lâmina, ressecamento provocado pelo ar e sobreposição celular (DAVEY, et al., 2006; FILIPA, 2013).

Nos últimos anos tem-se empregado a técnica molecular para o diagnóstico das IST que apresenta uma maior especificidade na detecção do DNA da *N. gonorrhoeae* (MASEK et al., 2009), utilizando o material depositado em meio de transporte de citologia em base líquida (BENZAKEN, 2016).

Os ensaios moleculares com o uso de PCR são importantes ferramentas para a detecção de microrganismos e podem contribuir para o diagnóstico precoce com alta sensibilidade, mesmo quando os alvos estão presentes em quantidades extremamente baixas (10 a 100 cópias de DNA). Nas duas últimas décadas, os testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT, do inglês nucleic acid amplification test) foram desenvolvidos e introduzidos para a detecção específica do DNA/RNA da *N. gonorrhoeae*.

2. JUSTIFICATIVA

A prevalência das infecções por *N. gonorrhoeae* é a segunda mais alta dentre as IST bacterianas, ficando atrás apenas das infecções por *Chlamydia trachomatis*. Durante 2005 a 2008, o número mundial de casos reportados de infecções gonocócicas aumentou em 21% em adultos entre 15 e 49 anos. Além disso, a OMS estimou que ocorreram 340 milhões de casos novos de infecção por *N. gonorrhoeae* em 2017 no mundo (OMS, 2017).

Apesar de altamente frequente, ao realizar análise em literatura percebe-se uma escassez de informação acerca da epidemiologia das infecções por *N. gonorrhoeae*, principalmente no território brasileiro, provavelmente por essa infecção não estar compreendida na lista nacional de doenças e agravos de notificação compulsória (LIMA et al., 2014).

Por não ser um agravo de notificação compulsória, raros os locais de serviços públicos brasileiros que oferecem sistematicamente a pesquisa desse patógeno e, nos serviços privados, normalmente só há pesquisa em casos sintomáticos ou quando um dos parceiros sexuais relata diagnóstico prévio de gonorreia, estes fatos levam a uma subnotificação de casos. As subnotificações e os registros recentes da elevada capacidade da *N. gonorrhoeae* em adquirir resistência aos antimicrobianos levaram as autoridades de saúde pública a preocupação que os métodos de diagnósticos sejam padronizados e consolidados (UNEMO et al., 2012; HOCKENBERRY et al., 2016).

Desse modo, a realização desse estudo justifica-se pela necessidade de uma padronização de identificação molecular de *N. gonorrhoeae* e pode ser relevante para a comunidade acadêmica da Universidade de Santo Amaro, no sentido de oferecer um protocolo operacional padrão para o diagnóstico molecular de *N. gonorrhoeae* que é o primeiro passo para a validação do diagnóstico no laboratório.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar a técnica de qPCR baseada no sistema SYBR Green, para diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae*;

3.2 Objetivos específicos

- Padronizar o diagnóstico da infecção por *N. gonorrhoeae* a partir de amostra de cultura;
- Desenvolver de um protocolo operacional padrão nos laboratórios de pesquisa da UNISA (URC) para diagnóstico de infecção por gonorreia;

4. MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Este é um estudo experimental e de abordagem qualitativa.

4.2 Desenho Do Estudo e Logística Laboratorial

O estudo parte de uma amostra de cultura de *N. gonorrhoeae*, seguido das etapas de extração e quantificação de DNA, realização de PCR em tempo real (com os primers selecionados) e obtenção dos resultados que consiste na análise de curva de desnaturação e curva de amplificação, etapas que serão descritas a seguir.

4.3. Extração e quantificação de DNA

Para realização da extração de DNA foi utilizada uma amostra de cultura de *N. gonorrhoeae*, gentilmente doada pela Profa. Silvia Figueiredo Costa do laboratório de Bacteriologia, Instituto de Medicina Tropical, USP. Uma alíquota de 5 ml da amostra meio líquido foi coletada, separada em tubo falcon e centrifugada a 1.500 rpm por 3 minutos, para a posterior realização da extração de ácidos nucleicos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células lavado com PBS estéril em duas etapas. Em seguida, foi iniciado o processo de extração de DNA seguindo as indicações e recomendações de acordo com o fabricante Thermo Fischer (PureLink™ Genomic DNA Mini Kit), veja apêndice I para o detalhamento da técnica.

Após o processo de extração de DNA, a amostra teve o rendimento quantificado pelo equipamento NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer Thermo) em triplicata (apêndice I). Em seguida, a amostra foi mantida congelada em -80 °C para posterior análise em PCR.

4.4 Seleção dos Primers

Com base na literatura (Vică et al, 2021), os primers foram selecionados: GGA TAC GAC GTA ACC TTG ACT ATG G (forward) e CCG ATG TAG AAG ACC CTT TTG C (reverse) e após a seleção foram solicitados ao fabricante Invitrogen. Os primers foram ressuspensos para a concentração de 100 nM e diluídos com

água ultrapura na proporção 1:10 (10 nM), para posterior preparo da mistura de reação (mastermix) para a qPCR.

4.5 RT-qPCR

O método molecular utilizado foi o PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR), uma evolução do PCR convencional (MASEK *et al.*, 2009). O método qPCR baseia-se na repetição exponencial da duplicação de cadeias de DNA da amostra, a partir dos primers selecionados, gerando quantidade de DNA suficiente para realizar as análises necessárias para a padronização.

O processo envolve as etapas de desnaturação, anelamento e polimerização, que podem ser acompanhadas em tempo real pelo software StepOne Software v2.3.

Para a ciclagem foi realizado o preparo do mastermix usando SYBR green, H₂O, o primer forward e o primer reverse previamente selecionados. O processo envolveu as etapas de desnaturação, anelamento e polimerização e a ciclagem foi padronizada em 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, e 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 90°C por 15 segundos, etapas essas que puderam ser acompanhadas em tempo real através do programa Step One Plus (Thermo). Para validação, o processo de PCR foi repetido em 3 momentos diferentes.

4.6 Obtenção da Curva de Desnaturação e da Curva de Amplificação

Ao final da ciclagem, através do software StepOne Software v2.3 foram obtidas as curvas de Desnaturação - a qual avalia a temperatura necessária para romper 50% da fita na etapa de desnaturação da fita dupla - e a curva de amplificação, pela qual observa-se a quantidade de ciclos necessários para observar a amplificação do material. Para obtenção das médias simples de cada valor (temperatura de desnaturação e curva de amplificação) somou-se os valores de cada variável obtido em cada um dos 3 testes e dividiu-se por 3. A análise de positividade das amostras se deu pela comparação das temperaturas de desnaturação com testes registrados previamente na literatura.

5. RESULTADOS

A partir da execução do método, um protocolo operacional padrão para o Unisa Research Center foi desenvolvido (APENDICE I e II).

A extração de DNA iniciou-se a partir de uma alíquota do meio líquido que continha a amostra positiva para *N. gonorrhoeae*, seguindo as recomendações do fabricante pelo Kit Qiagen DNA mini kit. Após esse processo, a quantificação de 3 dosagens em aparelho nanodrop revelou média de $10,27 \pm 0,29$ ng/ μ l, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Valores referentes a quantificação feita no Nanodrop da amostra extraída de gonorreia.

	ng/ μ l	A260/A280	A260/A230
Dosagem 1	10,60	1,76	1,33
Dosagem 2	10,10	2,04	1,58
Dosagem 3	10,10	2,07	1,48
Média \pm DP	10,27 \pm 0,29	1.95 \pm 0,17	1,46 \pm 0,13

Após a extração de DNA, pôde-se então iniciar a etapa de ciclagem em PCR da amostra. A técnica de PCR prevê primeiramente um preparo de uma mistura de reagentes (mastermix) que deve ser adicionado com a amostra para que a amplificação aconteça. A tabela 2 descreve a quantidade de cada produto utilizado, que foi multiplicado pelo número de amostras, que no caso foi uma amostra de cultura e duas amostras de H₂O ultrapura representando o controle negativo. Cada poço da placa de PCR recebeu 22 μ l de mix e 3 μ l da amostra correspondente.

Tabela 2- Relação da quantidade do produto para cada amostra, sempre multiplicando esses valores de acordo com a quantidade de amostras na placa, incluindo controles positivos e negativos.

Produtos - Reagentes	Quantidade para cada amostra (μ l)
Sybr Green MM	12,5 μ l
H ₂ O	7,5 μ l
Primer Forward	1 μ l
Primer Reverse	1 μ l

As condições de ciclagem para PCR utilizadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3: etapas de ciclagem e variações de temperatura configurados para realização do PCR.

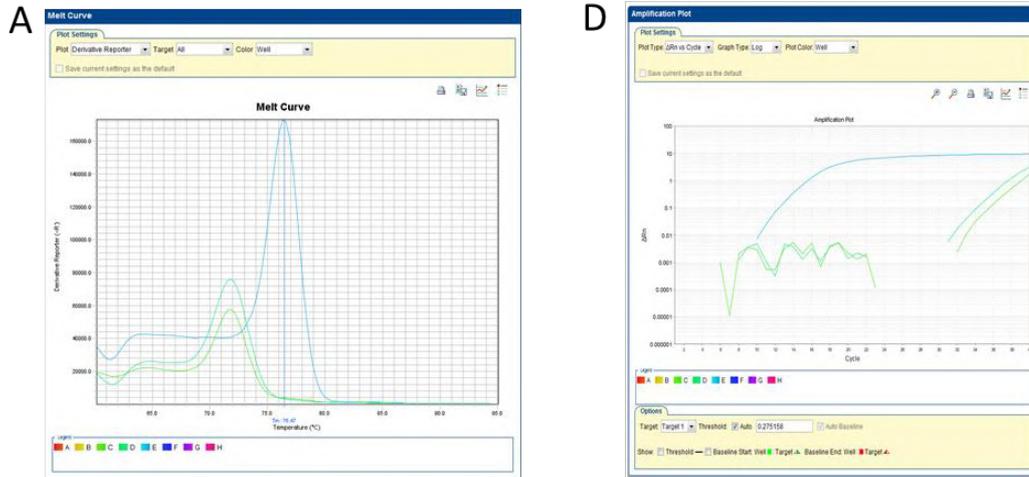
Estágio	Temperatura – tempo (min)
Holding Stage	95°C – 10:00
Cycling Stage	95°C – 0:15 // 60°C – 1:00
Curva de Desnaturação	95°C – 0:15 // 60°C – 1:00 // 90°C – 0:15

Após um tempo médio de 2 horas para cada uma das 3 ciclagens realizadas, pôde-se obter as curvas de desnaturação e curva de amplificação, como mostra a Figura 1. Após o término da reação, no software StepOne Plus seleciona-se a amostra a ser analisada e em seguida seleciona-se a opção “curva de melting”. Para comparação de duas amostras (por exemplo, controle x amostra) seleciona-se as duas amostras com a tecla “ctrl” pressionada, e em seguida seleciona-se a opção curva de melting, para níveis de comparação. A média das temperaturas de desnaturação foi de 76,86 °C (Tabela 4) e a curva de amplificação iniciou em 10 a 11 ciclos (Tabela 4 e Fig. 1).

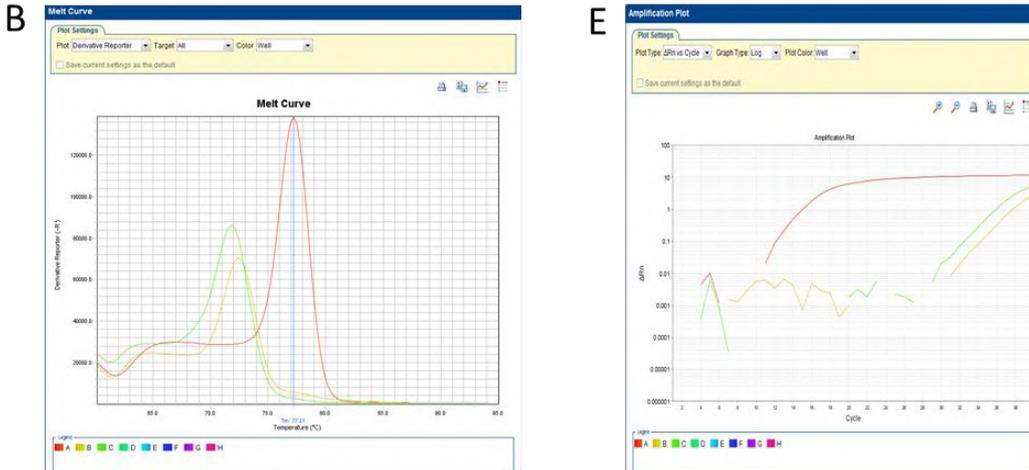
Tabela 4 – Descrição e média das temperaturas de desnaturação e curva de amplificação.

Experimentos	T. de desnaturação (°C)	Curva de amplificação
1	76,47	10
2	77,21	11
3	76,91	10
Média ± DP	76,86 ± 0.37	10,33 ± 0.58

Experimento 1



Experimento 2



Experimento 3

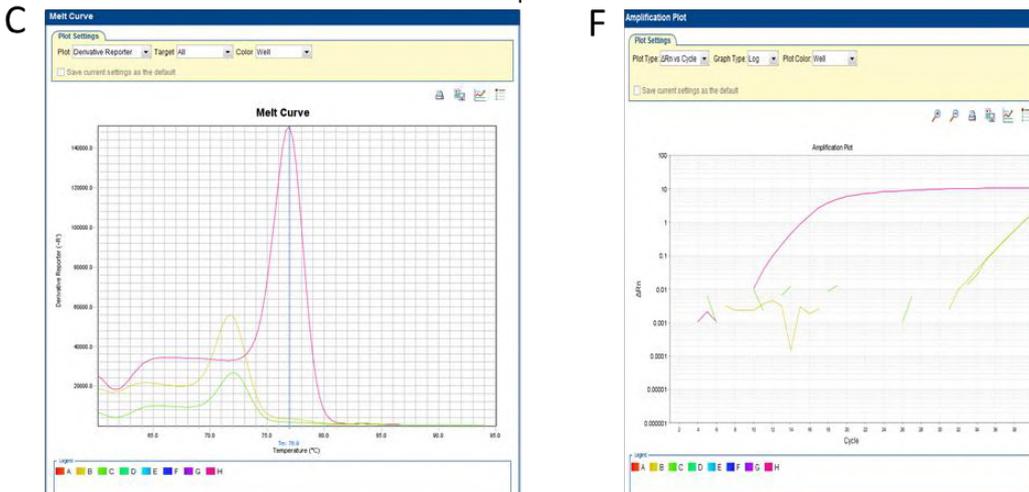


Figura 1 – Temperatura de Desnaturação e curva de amplificação da amostra de *N. gonorrhoeae*. O DNA extraído foi submetido a PCR em tempo real. São mostradas a temperatura de desnaturação (A, B e C) e a curva de amplificação (D, E e F) do controle negativo e da amostra de *N. gonorrhoeae* de três experimentos realizados independentemente.

6. DISCUSSÃO

A utilização da citologia líquida, como ponto de partida para o protocolo a ser desenvolvido, pode ser considerada um diferencial e uma vantagem desse estudo. A citologia em meio líquido foi desenvolvida na década de 1990 e implantada com objetivo principal de atender demandas computadorizadas no diagnóstico de câncer de colo uterino através do diagnóstico citopatológico (FILIPA, 2013). Além disso, esse método também facilitou o diagnóstico molecular, uma vez que um mesmo material encaminhado para o estudo citológico pode ser utilizado para a obtenção do material genético (LUPPI *et al*, 2011). Assim, possibilitando a detecção do DNA do HPV e outros micro-organismos como *Chlamydia Trachomatis* e *N. gonorrhoeae*. Outra vantagem do uso do material de citologia líquida para o diagnóstico molecular é o estabelecimento de padrões de coleta, reduzindo variáveis do processo de interferência humana e gerando menos desconforto para os clientes, uma vez que uma única coleta é utilizada para múltiplas análises. (RAMOS *et al.*,2002; DARWIN *et al.*, 2002).

Relativo à eficiência do método de PCR para diagnóstico de *N. Gonorrhoeae*, Akduman *et al.* (2002) em seus estudos evidenciaram que a amplificação via PCR em tempo real é mais sensível para as cervicites e uretrites do que a cultura, pois detecta mais rápido e com menos material, ou sejam detecta pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas, independente da forma de apresentação. Diversos autores destacaram em seus estudos a capacidade dessa técnica detectar até uma única partícula plasmídica de *C. Trachomati*, revelando alta sensibilidade do método (PALMER *et al.*,2003; HAUGLAND *et al.*, 2010; GARROW *et al.*, 2002).

Propriamente dita, a reação de PCR consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de iniciadores de uma sequência de DNA-alvo, denominados *primers*. A utilização de primers específicos para cada elemento de investigação é essencial porque são eles que definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica. A literatura vem afirmando que a sensibilidade destes testes de amplificação do DNA é em torno de 20% maior do que as demais técnicas de cultura, imunofluorescência direta e enzimoimunoensaio (VALONES *et al.*, 2009).

Nos testes desse estudo, foi utilizado o método de SYBR Green para fluorescência. O SYBR Green é um corante que se liga à alça menor do DNA dupla fita. No momento que essa ligação ocorre, a intensidade da emissão fluorescente aumenta. Quanto mais amplicons de dupla fita forem produzidos, o sinal do corante aumenta ainda mais. A análise para esse método dá-se através da curva de Desnaturação, que é gerada por um aquecimento lento e gradativo da dupla fita amplicom-corante medindo a mudança na fluorescência que resulta quando a sonda desnaturada, ou “melts”, fora do amplicom. Cada DNA tem sua temperatura de desnaturação específica, e esta é definida como a temperatura em que 50% de DNA torna-se fita simples. Estas temperaturas são determinadas pelo comprimento da fita dupla de DNA e o grau de complementaridade entre as fitas. Caso a fluorescência do corante seja monitorada continuamente através dos ciclos de temperatura, a desnaturação do produto pode ser observada como uma rápida perda de fluorescência próxima à temperatura de desnaturação (VALONES et al., 2009).

A média simples de temperatura de desnaturação obtida nos 3 experimentos desse estudo está de acordo com os estudos de VENTER et al. (2019) e Vicã et al. (2021). Estes trabalhos sobre a detecção de *N. gonorrhoeae* através da técnica de PCR em tempo real utilizam 35 ciclos após uma desnaturação de um minuto a 95°C. O número de ciclos obtidos nas curvas de amplificação também está de acordo com outros estudos registrados em literatura (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

Para realização do teste com amostras clínicas, cada amostra clínica previamente armazenada em meio de citologia líquido deve passar pelo processo de extração do DNA genômico. O DNA deve ser quantificado e adicionado juntamente com os reagentes para a PCR (mastermix) em placa para PCR. Cada série de teste deve conter os controles positivos, que nesse caso podem ser as amostras obtidas da cultura de *N. gonorrhoeae* como demonstrado no presente estudo, e o controle negativo com água substituindo a amostra. A análise do resultado de PCR em amostras clínicas se dá pela comparação das curvas de das amostras de controle positivo com as curvas de desnaturação das amostras clínicas. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi padronizar o diagnóstico molecular de *N. gonorrhoeae* pela técnica de PCR em tempo real utilizando Sybr Green para a detecção do produto amplificado. O diagnóstico molecular otimiza os diagnósticos e rastreios de infecções tão silenciosas como a de *N. gonorrhoeae*, mas que têm implicações graves como a infertilidade. A técnica permite ainda reconhecer patógenos de cultivo trabalhoso ou impossível de ser cultivado ou que se apresenta em reduzida quantidade na amostra clínica, além de reduzir o tempo de janela imunológica (LUPPI *et al.*, 2011). O emprego dessa tecnologia no rastreio de doenças infecciosas pode aumentar a qualidade de vida da população, além de impedir a prática de tratamento empírico e o uso indiscriminado de antimicrobianos, que acaba selecionando microrganismos resistentes, tornando tratamentos posteriores mais difíceis e dispendiosos.

Portanto, destaca-se que os testes moleculares são mais sensíveis do que a cultura para o diagnóstico da gonorreia. No entanto, por ser um método de diagnóstico recente e ainda em padronização, além de necessitar de equipamentos específicos, sua utilização no sistema único de saúde ainda é limitada, justificando o desenvolvimento de maiores estudos que suportem sua padronização. Sugere-se, ainda, a realização de estudos com amostras clínicas para comparação com as amostras analisadas nesse estudo para o estabelecimento do diagnóstico molecular nos laboratórios de pesquisa da UNISA (URC).

8. REFERÊNCIAS

Akduman D, Ehret JM, Messina K, Ragsdale S, Judson FN 2002. Evaluation of a strand displacement amplification assay (BD ProbeTec-SDA) for detection of *N. gonorrhoeae* in urine specimens. **J Clin Microbiol** 40: 281-283.

Barbosa MJ, Moherdau F, Pinto VM, Ribeiro D, Cleuton M, Miranda AM. Prevalence of *N. gonorrhoeae* and Chlamydia trachomatis infection in men attending STD clinics in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2010;43(5):500-3. doi: 10.1590/S0037-86822010000500005

BENZAKEN, A. **Departamento de Vigilância, Prevenção, e controle das IST, de HIV/AIDS e das Hepatites**. 2016. Virais.

BRASIL. Ministério da saúde, m. d. (2006). **Caderno de atenção básica Nº 18** HIVAids, hepatites e outras DST. Brasília.

BRASIL. **Ministério da Saúde** - Secretaria de Vigilância em Saúde - Departamento de Vigilância, PREVENÇÃO E CONTROLE DAS INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS, DO HIV/AIDS E DAS HEPATITES VIRAIS: 2015.

Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for the laboratory-based detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae--2014. **MMWR Recomm Rep**. 2014 Mar 14;63(RR-02):1-19. PMID: 24622331; PMCID: PMC4047970.

DARWIN, L.H.; CULLEN, A.P.; ARTHUR, P.M.; LONG, C.D.; SMITH, K.R.; GIRDNER, J.L.; QUINN, T.C.; LORINCZ, A.T. Comparison of Digene Hybrid Capture 2 and conventional culture for detection of Chlamydia trachomatis and *N. gonorrhoeae* in cervical specimens. **Journal Clinical Microbiology**. v. 40, n. 2, p. 641-644, 2002.

DAVEY, E et al. Accuracy of reading liquid based cytology slides using the ThinPreplmager compared with conventional cytology: prospective study. **BMJ**, v. 335, n.7609, p. 31, 2007.

FEBRASGO. Resistência de *N. gonorrhoeae* a antimicrobianos na prática clínica: como está o Brasil? **Femina**. 2018; 46 (2): 76-89

FILIPA, D. Citologia de Base Líquida: Vantagens e desvantagens, aplicações da técnica e comparação de técnicas. **ESTSP Politécnico do Porto** (2013).

Garrow SC, Smith DW, Harnett GB 2002. The diagnosis of chlamydia, gonorrhoea, and trichomonas infections by self obtained low vaginal swabs, in remote northern Australian clinical practice. **Sex Transm Infect** 78: 278-281.

Gewirtzman A, Bobrick L, Conner K, Tyring SK. Epidemiology of sexually transmitted infections. In Gross G, Tyring SK, editors. Sexually transmitted infections and sexually transmitted diseases. **Cham**: Springer; 2011. p. 13-34.

Haugland S, Thune T, Fosse B, Wentzel-Larsen T, Hjelmevoll SO, Myrmet H 2010. Comparing urine samples and cervical swabs for Chlamydia testing in a female population by means of Strand Displacement Assay (SDA). **BMC Wom Health** 10: 1-6.

Hockenberry AM, Hutchens DM, Agellon A, So M. Attenuation of the type IV pilus retraction motor influences *N. gonorrhoeae* social and infection behavior. **mBio**. 2016;7(6):e01994-16. doi: 10.1128/mBio.01994-16

Jalil EM, Pinto VM, Benzaken AS, Ribeiro D, Oliveira EC, Garcia EG, et al. Prevalência da infecção por clamídia e gonococo em gestantes de seis cidades brasileiras. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2008;30(12):614-9. doi: 10.1590/S0100-72032008001200005

Lima YAR, Turchi MD, Fonseca ZC, Garcia FLB, Cardoso FAB, Reis MNG, et al. Sexually transmitted bacterial infections among young women in Central Western Brazil. **Int J Infect Dis**. 2014;25:16- 21. doi: 10.1016/j.ijid.2014.03.1389

LUPPI, C.G.; OLIVEIRA, R.L.S.; VERAS, M.A.; LIPPMAN, S.A.; JONES, H.; JESUS, C.H.; PINHO, A.A.; RIBEIRO, M.C.; CAIAFFA-FILHO, H. Diagnóstico precoce e os fatores associados às infecções sexualmente transmissíveis em mulheres atendidas na atenção primária. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 14, n.3, p. 467-77, 2011.

Masek BJ et al. Performance of three nucleic acid. **Journal of Clinical Microbiology**, 2009.

Palmer HM, Mallinson H, Wood RL, Herring AJ 2003. Evaluation of the specificities of five DNA amplification methods for the detection of *N. gonorrhoeae*. **J Clin Microbiol** 41: 835-837.

RAMOS, M.; BECKER, D.; GERMANY, C.; RITTER, A.T.; PERIN, M.T.; SANDER, M.A.; FILGUEIRAS, A.L.; CESTARI, T. Estudo populacional de prevalência de Chlamydia trachomatis e Neisseria gonorrhoea pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em urina de gestantes adolescentes e mulheres atendidas em ambulatórios de ginecologia em hospital público em Porto Alegre, Brasil. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**; v. 14, n. 6, p. 4-8, 2002.

Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. **Future Microbiol**. 2012;7(12):1401-22. doi: 10.2217/fmb.12.117

Valones MA, Guimarães RL, Brandão LA, de Souza PR, de Albuquerque Tavares Carvalho A, Crovela S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Braz J Microbiol**. 2009 Jan;40(1):1-11. doi:

10.1590/S1517-83822009000100001. Epub 2009 Mar 1. PMID: 24031310; PMCID: PMC3768498.

World Health Organization. Sexually Transmitted Infections (STIs).2016.

Mihaela Laura Vică, Ioana Glevitzky, Mirel Glevitzky, Costel Vasile Siserman, Horea Vladi Matei, Cosmin Adrian Teodoru. Antibacterial Activity of Propolis Extracts from the Central Region of Romania against *Neisseria gonorrhoeae*. **Antibiotics (Basel)**. 2021 Jun;10(6):689. doi: 10.3390/antibiotics10060689 PMCID: PMC8226552 PMID: 34201299.

APENDICE I

POP – Extração de DNA e Quantificação da amostra

Objetivo: Extrair o DNA de *N. Gonorrhoeae* da amostra de cultura e quantificar a amostra de DNA no aparelho Nanodrop

Materiais:

- Pipetas e ponteiras com filtro;
- Amostra;
- Eppendorf para amostra extraída;
- DNA extraction reagent kitQIAamp;
- Termobloco
- Álcool etílico 100%
- Centrifuga para eppendorf;

Método:

Extrair o DNA da amostra de cultura de *N. Gonorrhoeae* seguindo as informações do fabricante do Kit de extração de DNA utilizado. Após a extração da amostra quantificar no aparelho NanodropOne a amostra extraída.

Instruções:

Preparo da amostra:

- Centrifugar a amostra com 1.500g por 6 minutos em temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante, restando o pellet de células;
- Colocar 200 µl de PBS estéril e pipetar para misturar;
- Separar 200 µl da solução em eppendorf;
- Centrifugar em 1.500 rpm por 5 minutos;
- Descartar o sobrenadante no descarte com hipoclorito, restando o pellet de células;

- Adicionar 200 µl de PBS estéril;
- Iniciar Extração;

Extração:

- Identificar o eppendorf de acordo com a amostra correspondente;
- Ligar o Termobloco na temperatura de 55° C;
- Adicionar 20 µl de Proteinase K;
- Adicionar 200 µl de Buffer de Lise;
- Vórtex por 10 segundos;
- Centrifugar 15.000 rpm por 10 segundos;
- Termobloco em 55° C por 10 minutos;
- Adicionar 200 µl de Álcool Etílico 100% e misturar com a pipeta (up and down);
- Transferir o líquido para a coluna do kit (aproximadamente 640 µl);
- Centrifuga em 15.000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente e após centrifugação trocar a coluna de baixo descartando a antiga num recipiente próprio para eppendorfs colunas e sílicas, e desprezando o líquido no descarte de biologia molecular;
- Adicionar 500 µl de Buffer de Lavagem/Wash 1;
- Centrifuga em 15.000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente e após centrifugação trocar a coluna de baixo descartando a antiga num recipiente próprio para eppendorfs colunas e sílicas, e desprezando o líquido no descarte de biologia molecular;
- Adicionar 500 µl de Buffer de Lavagem/Wash 2;
- Centrifuga em 15.000 rpm por 2 minutos em temperatura ambiente e após centrifugação trocar a coluna de baixo descartando a antiga num recipiente próprio para eppendorfs colunas e sílicas, e desprezando o líquido no descarte de biologia molecular;
- Adicionar 200 µl de Buffer Eluição/AE;
- Marcar novo eppendorf e adicionar a sílica com o buffer Eluição/AE;
- Centrifuga 15.000 rpm por 1 minuto em temperatura ambiente;

- Reservar o eppendorf com o líquido final.

Nanodrop:

- Ligar o aparelho;
- Remover papel de proteção no sensor com cuidado e esperar carregar;
- Selecionar DNA fita dupla;
- Fazer blank com água MiliQ;
- Pipetar a amostra com 2 μ l no sensor e selecionar Measure;
- Anotar o resultado (concentração ug/ μ l, as taxas 260/280 e 260/230) limpar o sensor e trocar o papel de proteção.
- Desligar o aparelho.

Descarte:

- Ponteiras: caixas para materiais perfuro cortantes;
- Líquidos: recipientes próprios para descarte de líquidos;
- Microtubos e materiais plásticos: recipientes próprios para descarte de plásticos

APENDICE II

POP – PCR em Tempo Real

Objetivo: Diagnóstico molecular de *N. gonorrhoeae*.

Materiais:

- Pipetas e ponteiros com filtro;
- Amostras, controles positivos e controle negativo;
- Eppendorf para o Mix;
- Sybr Green Master Mix, H₂O DNase free, Primer forward e primer reverse previamente diluído (10nM);
- Placa do PCR e adesivo;

Método:

Preparar o mastermix para ser usado no qPCR, juntamente com DNA extraído, que servirá como molde para ser amplificado com os parâmetros necessários de temperatura, tempo e ciclos. No final, obtém-se o resultado (curva de temperatura de desnaturação e ciclos).

Mastermix:

O valor, da quantidade do produto para cada amostra, deve ser multiplicado pela quantidade de amostras na placa, incluindo controles positivos e negativos.

Relação da quantidade do produto para cada amostra.

Produtos - Reagentes	Quantidade para cada amostra (µl)
Sybr Green MM	12,5µl
H ₂ O	7,5µl
Primer F	1µl
Primer R	1µl

Instruções:

- Ligar o computador e máquina do PCR em tempo real;
- Preparar a estação de trabalho (sala de extração) para preparo do mastermix e organizar os materiais;
- Preparar o Mix de acordo com a tabela acima, de acordo com a quantidade de amostras/controles obtidas para o estudo;
- Preparar a estação de trabalho (sala biomol) para o preparo da placa, organizar os materiais e o desenho da placa;
- Pipetar 22 μ l do Mix para cada amostra na placa de PCR;
- Adicionar 3 μ l do DNA extraído em cada poço de acordo com o desenho da placa; lembrar do controle negativo e positivo;
- Ao adicionar a amostra, pipetar para misturar o conteúdo com o Mix;
- Trocar de ponteira a cada amostra pipetada em cada poço;
- Vedar a placa com adesivo;
- Iniciar a programação do PCR no computador.

Programação do PCR:

- Use mesma senha do nome do usuário para logar.
- Ignorar aba;
- Advanced setup;
- Identificar o experimento;
- Usar: StepOnePlus (96 wells), Quantation – Standard Curve, SYBR Green, Standard (2h), e adicionar a curva de Desnaturação;
- Colocar 1 target e número de Sample de acordo com a quantidade de amostras
- Adicionar o Target em todos os espaços preenchidos na placa;

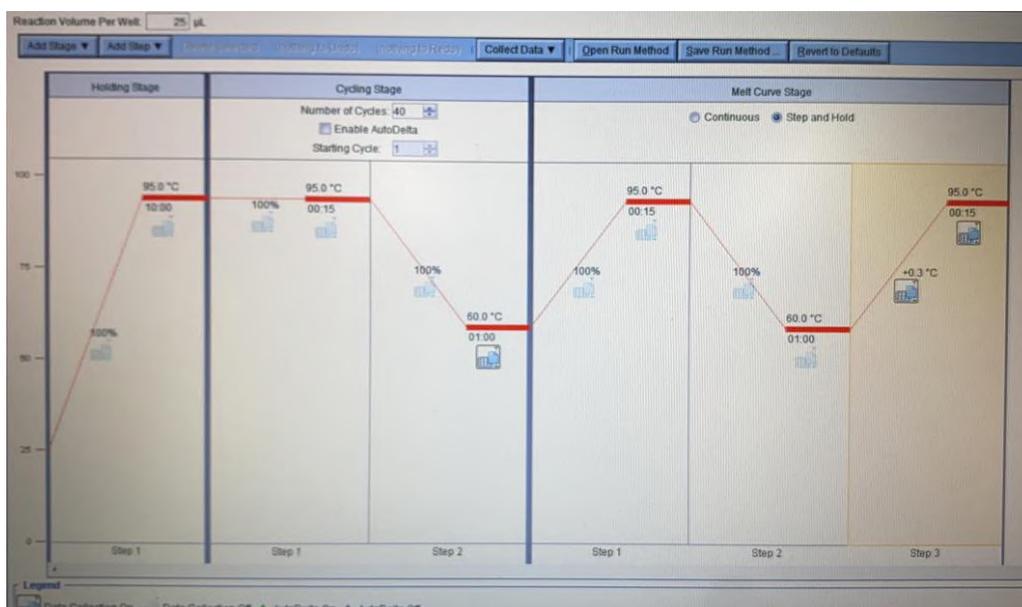
- Identificar o mapa das amostras de acordo com a montagem, sendo as amostras para análise (U), os controles positivos (S) e negativos (N);
- Alterar para 25µl no ciclo;
- Salvar na pasta correspondente;
- Iniciar corrida.

Ciclagem do PCR:

Holding Stage: 95°C – 10:00

Cycling Stage: 95°C – 0:15 // 60°C – 1:00

Curva de Desnaturação: 95°C – 0:15 // 60°C – 1:00 // 90°C – 0:15



Após o término da reação, no ampliativo StepOne Plus seleciona-se a amostra a ser analisada e em seguida seleciona-se a opção “curva de melting”. Para comparação de amostras controle x amostra seleciona-se as duas amostras com a tecla “ctrl” pressionada, e em seguida seleciona-se a opção curva de melting, para níveis de comparação. Amostras positivas terão mesma temperatura de melting dos controles positivos.

Descarte:

- Ponteiros: caixas para materiais perfuro cortantes;
- Líquidos: recipientes próprios para descarte de líquidos;
- Microtubos e materiais plásticos: recipientes próprios para descarte de plásticos

