GUILHERME BARRETO CAMPOS

**DETECÇÃO DE *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* E *M. penetrans* NO TRATO UROGENITAL FEMININO E A SUA
RELAÇÃO COM POLIMORFISMOS GENÉTICOS E EXPRESSÃO
DE CITOCINAS EM MULHERES ATENDIDAS NO MUNICÍPIO DE
VITÓRIA DA CONQUISTA - BA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2013

GUILHERME BARRETO CAMPOS

**DETECÇÃO DE *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* E *M. penetrans*
NO TRATO UROGENITAL FEMININO E A SUA RELAÇÃO COM
POLIMORFISMOS GENÉTICOS E EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM
MULHERES ATENDIDAS NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA DA
CONQUISTA - BA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Campos, Guilherme Barreto.

Detecção de *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* e *M. penetrans* no trato urogenital feminino e a sua relação com polimorfismos genéticos e expressão de citocinas em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista, BA / Guilherme Barreto Campos. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Micoplasmas genitais.

Versão do título para o inglês: Detection of *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* and *M. penetrans* in the urogenital tract and their association with cytokines genetic polymorphism and expression in women from Vitória da Conquista, Brazil.

1. Infecção sexualmente transmissível 2. *Mycoplasma hominis* 3. *M. genitalium* 4. *M. penetrans* 5. Micoplasmas genital 6. Polimorfismo de citocinas I. Timenetsky, Prof. Dr. Jorge II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB060/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Guilherme Barreto Campos.

Título da Dissertação: Detecção de *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* e *M. penetrans* no trato urogenital feminino e a sua relação com polimorfismos genéticos e expressão de citocinas em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista, BA.

Orientador(a): Prof. Dr. Jorge Timenetsky.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 13 de junho de 2011.

PARECER 998/CEP

6

A Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 18.05.2011, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Deteção de moléculas no trato urogenital feminino e a sua relação com polimorfismos genéticos e expressão de citocinas em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista - BA*" sob responsabilidade de execução dos autores Prof. Dr. JORGE TIMENETSKY e o aluno GUILHERME BARRETO CAMPOS.

Cabe a pesquisadora executante elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX. 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **18.05.2012.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Aos meus inefáveis pais que tanto amo, Eliane e Geraldo, dedico esse trabalho e agradeço pela minha formação profissional e pessoal. Este trabalho é símbolo de uma vitória tão minha quanto de vocês.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro, sem o qual este estudo não seria realizado.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a todos os espíritos de luz que me acompanharam até aqui.

Aos meus pais, Geraldo e Eliane, meus irmãos, Leonardo e Francisco, minha cunhada Thaís e meu sobrinho Luís que, apesar da distância, sempre me deram, amor e apoio, alicerce para concretização deste trabalho. Muito obrigado “Família Campos”!!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Timenetsky, pela confiança depositada, por abrir as portas do laboratório para o desenvolvimento deste trabalho e por partilhar de forma tão humana e humilde seu conhecimento.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia (IMS/CAT) e por não medir esforços para realização deste trabalho. Obrigado por partilhar do seu conhecimento e experiência de forma tão singular e agradável ao longo destes anos.

À Enf^a. Tássia Neves Lobão (Tatá), por sua fibra, tenacidade e competência enquanto profissional e por compartilhar com companheirismo de todas as emoções no desenvolvimento deste trabalho.

À Aricelma França (Celminha) pelo competente apoio técnico-laboratorial, essencial para execução deste trabalho, por me dar o prazer de tê-la como amiga e por contribuir no meu crescimento profissional e pessoal.

Aos amigos, contemporâneos ou não, do Laboratório de Micoplasmas, Aline, Ana Magda, Ana Márcia, Ana Terra, Angelita, Carol, Carlos, Celma, Denise, Lucas, Renata, Tássia e Verena pelas palavras e gestos de ajuda e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho. Por diferentes motivos sou muito grato a cada um de vocês.

À Prof^a. Ms. Lucineide Santos, ao Prof. Dr. Djanilson Barbosa e à Prof^a. Dra. Tiana Baqueiro pela valiosa colaboração científica neste trabalho.

À Prof^a. Dra. Raquel Gestinari do Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Bahia (IMS/CAT) por abrir as portas de seu laboratório e, à sua orientanda Fernanda Teixeira pelo valioso auxílio com a técnica de MS-PCR e amizade construída.

À família do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal da Bahia (IMS/CAT) (Nathan, Aline, Beatriz, Clarissa, Daniel, Danilo, Eliana, Ewerton, Hellen, Ícaro, Igor, Izadora, Jéssica, Karol, Laiziane, Mariângela, Maysa, Pollianna, Simone,

Suerda, Suzelle, Suzi, Tamara, Tássia, Thiago e Verena.) por toda a ajuda laboratorial, pelos momentos agradáveis compartilhados no ambiente de trabalho e por tornarem esta jornada menos árdua.

A todas as mulheres que participaram deste estudo, por compartilharem suas histórias de vida e por doarem material clínico para análise. Sem a participação de cada uma delas este trabalho não seria possível. Muito obrigado por contribuírem com este passo importante em minha vida e com a ciência.

A todos os profissionais dos postos de saúde que desde o primeiro momento se mostraram receptivos, solícitos e atenciosos. Sem dúvida, a entrega e dedicação com que contribuíram neste estudo fizeram com que dificuldades fossem superadas e o objetivo fosse alcançado. Foi um prazer compartilhar desta experiência tão enriquecedora com profissionais tão competentes. Muito Obrigado!

À Prof^a. Dra. Joanne Messick por abrir as portas do Laboratório de Patobiologia Veterinária da Purdue University – EUA, para realização dos experimentos de sequenciamento. E ao *Genomics Core Facility*, da mesma universidade, setor responsável pela realização da técnica.

Aos amigos do Laboratório de Patobiologia Veterinária da Purdue University, Ana Márcia, Naíla, Andrea, Cristina, Yo-Fon Chu e April pela atenção, presteza, amizade, por compartilharem seu conhecimento e por serem companhias tão agradáveis durante a minha estadia fora do país.

A Ana Márcia e Ricardo por me acolherem em sua casa em West Lafayette durante o período de realização do sequenciamento e por se tornarem amigos tão admirados por suas diversas qualidades. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio e carinho.

Aos funcionários da sala de esterilização do ICB II, pela enorme prestatividade.

Aos funcionários, Elizabete, Naíde, Bruno e Gisele da secretaria do departamento de microbiologia do ICB II. Muito Obrigado.

Aos funcionários da biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas pelo auxílio prestado na preparação deste trabalho.

Aos meus amigos de longa data, Danilo, Daniel, Simone, Lucas, Aline, Verena, Tiago Oliveira e Raquel por serem tão marcantes na minha vida e na minha trajetória acadêmica. Obrigado por tudo! Amo vocês!

Aos amigos feitos no Departamento de Microbiologia do ICB/USP durante o mestrado: Luís, Aline Ignácio, Marília, Gisela, Viviane Arenas, Rosana, Rafael, Sheila, Tânia e Márcia (Laboratório de Anaeróbios) Maristela (Laboratório Fisiologia e genética bacteriana), Lucas (Laboratório Microbiologia Oral), Julian, Felipe, Lucas, Leandro, Diego, Oriana, (Laboratório Fungos dimórficos patogênicos), Edinei (Laboratório Micotoxinas), Luana, Leandro e Tchica (Lab. Resistência Bacteriana) e Fernando (Lab. Prof. Biogênese mitocondrial). Ainda que tenhamos diferentes caminhos acadêmicos, espero cultivar a amizade com o passar do tempo.

Aos amigos do “Grupo Show” pela amizade, paciência e companheirismo com a minha pessoa ao longo destes anos. Saibam que tenho admiração, afeto e estima por cada um de vocês. Obrigado por torcerem por mim e por serem sinônimo de lealdade e amizade ao longo destes nove anos.

Aos amigos Wesley, Gustavo, Felipe, Isaac e Tatiane por torcerem por mim, por serem testemunhas da minha jornada até aqui e sempre darem palavras de incentivo. Muito obrigado!

Aos meus companheiros de casa: Luís Llanco (Lucho), Luís Luna (Luchín) e Marco por serem ouvidos às minhas angústias e alegrias nos últimos dois anos. Obrigado ainda pela amizade e por me permitirem experienciar de forma diferenciada e surpreendente a cultura do Peru.

Aos membros da “Família Marques” por me acolherem desde os primeiros momentos da minha mudança para a capital paulista, por serem minha segunda família e me propiciarem momentos agradabilíssimos. Serei eternamente grato por tudo que fizeram e fazem por mim.

Aos demais amigos e familiares não citados e que ao longo da minha vida ou dos dois últimos anos me desejaram toda a força e sucesso. Muito Obrigado!

A todos, aqui não mencionados, que de alguma forma viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

“A felicidade só é real quando é compartilhada.”

Christopher McCandless

RESUMO

CAMPOS, G. B. **Detecção de *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* e *M. penetrans* no trato urogenital feminino e a sua relação com polimorfismos genéticos e expressão de citocinas em mulheres atendidas no município de Vitória da Conquista, BA.** 2013. 139 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Mycoplasma hominis, *M. genitalium* e *M. penetrans* ainda desafiam a compreensão de sua biologia principalmente quando associados a infecções do trato urogenital. Entre as diversas justificativas da literatura, o estudo das citocinas nos indivíduos doentes indicam que este aspecto contribui no esclarecimento do oportunismo clássico destas bactérias. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi inicialmente detectar, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da PCR quantitativa (qPCR), as espécies de micoplasma mencionadas em mulheres e relacionar os achados com variáveis comportamentais, clínico-demográficas, presença de outros microrganismos de importância ginecológica e o polimorfismo das citocinas IL-1 β e IL-6. Foram obtidos dados clínico-demográficos, amostras de swab vaginal e sangue de 302 mulheres incluindo-se mulheres saudáveis. Foi detectada a frequência de 76,2% para a classe dos *Mollicutes*, 15,9% para *M. hominis* e 1,7% para *M. genitalium* na PCR convencional. Frequência de 31,8% e 28,1% na qPCR foi encontrada para *M. genitalium* e *M. hominis* respectivamente. A infecção por micoplasmas genitais, principalmente quando analisados pela qPCR, esteve significativamente associada aos sinais e sintomas clínicos de Infecções sexualmente transmissíveis. A frequência de *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis* e *Chlamydia trachomatis* foi de 3,0%, 21,5%, 42,4%, 1,7% respectivamente. Além disso, co-infecção destas espécies com micoplasmas foi encontrada. No polimorfismo da IL-1 β , houve maior prevalência do genótipo CC, no entanto, o alelo T foi relacionado ao pequeno aumento dos níveis da interleucina no grupo caso. Para o polimorfismo de IL-6, o genótipo GG apresentou maior frequência, e o genótipo GC foi associado ao aumento dos níveis plasmáticos da citocina no grupo caso. O aumento dos níveis de IL-1 β foi associado à presença *M. hominis* e ao fato das mulheres apresentarem sinais ou sintomas de infecção. Os resultados mostraram que a qPCR foi uma técnica mais sensível e que os polimorfismos de citocinas podem desempenhar papel importante na ativação do sistema imune durante resposta inflamatória. O fator comportamental foi associado à detecção dos micoplasmas e as co-infecções encontradas sugerem a cooperação da diversidade microbiana no estabelecimento, persistência e manifestação clínica da infecção vaginal.

Palavras-chave: Infecção Sexualmente Transmissível. *M. hominis*. *M. genitalium*. *M. penetrans*. Polimorfismo de citocinas.

ABSTRACT

CAMPOS, G. B. **Detection of *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* and *M. penetrans* in the urogenital tract and their association with cytokines genetic polymorphism and expression in women from Vitória da Conquista, Brazil.** 2013. 139 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Mycoplasma hominis, *M. genitalium* and *M. penetrans* remain as a challenge to understand their biology especially when associated to urogenital tract infections. The cytokines studies in infected individuals, helps to understand better their classic opportunistic features. Therefore the aim of the present study was initially focused to detect by Polymerase Chain Reaction (PCR) and quantitative PCR (qPCR), the mentioned mycoplasma in the urogenital tract of women. In addition it was included to correlate the findings with the women behavioral variables, clinical and demographic characteristics, presence of other microorganisms of gynecological importance and the polymorphism of IL-1 β and IL-6. The studied clinical material was: vaginal swabs and peripheral blood samples from 302 women, including healthy individuals. Frequency for Mollicutes class detection was 76.2%, for *M. hominis* was 15.9% and 1.7% for *M. genitalium* using the conventional PCR methodology. However, the qPCR methodology detected *M. genitalium* and *M. hominis* respectively in 31.8% and 28.1%. The results obtained with qPCR, was significantly associated with the clinical signs and symptoms of studied genital infections. The frequency of *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* was 3.0%, 21.5%, 42.4%, 1.7% respectively. These findings were associated as co-infections with the detected mycoplasma. The genotype CC of IL-1 β , was more prevalent; however, the T allele was related to a leak increase of this interleukin levels in the group case. The genotype GG polymorphism of IL-6, higher frequency was of the genotype GG, and the GC genotype was associated with increased plasma levels of the cytokine in the group case. Increased levels of IL-1 β was associated to the presence of *M. hominis* and to signs and/or symptoms of genital infection in the studied women of the study. The PCR methodology showed to be more sensitive and the genetic polymorphisms of cytokines were associated with the inflammatory response. The habits of studied women were associated with the detection of mycoplasma and co-infections with other agents of genital infections.

Keywords: Sexually Transmitted Infection (STI). *M. hominis*. *M. genitalium*. *M. penetrans*. Genital mycoplasma. Cytokine polymorphism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL –	Microlitro
μm –	Micrômetros
$\mu\text{m/s}$ –	Micrômetros por segundo
A –	Adenina
AcetilCoA –	Acetil Coenzima A
AIDS –	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
atm –	Atmosfera
ATP –	Adenosina tri-fosfato
C –	Citosina
CC –	Homozigoto CC
CDC –	Centers for Disease Control and Prevention
CO_2 –	Gás carbônico
cPCR –	PCR convencional
Ct –	Cycle Treshold (Sinal de fluorescência que pode ser detectado)
CT –	Heterozigoto CT
DIP –	Doença Inflamatória Pélvica
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP –	Deoxinucleotídeo trifosfato
DST –	Doença Sexualmente Transmissível
DV –	Doença Venérea
EDTA –	Acido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA –	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
EPI –	Equipamento de Proteção Individual
g –	Gramas
G –	Guanina
GC –	Heterozigoto GC
GG –	Homozigoto GG
HIV –	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC –	Intervalo de Confiança
IFN- γ –	Interferon gama
IL –	Interleucina
IL-1 β –	Interleucina 1 Beta
IL-6 –	Interleucina 6
IST –	Infecção Sexualmente Transmissível
kDa –	Kilodaltons
Kpb –	Kilopares de bases
mg –	Miligramas
MgCl_2 –	Cloreto de Magnésio

min –	Minuto
mL –	Mililitro
mM –	Milimolar
MS-PCR –	Mutagenically separated PCR
NK –	Natural Killers
°C –	Graus celsius
OMS –	Organização Mundial de Saúde
OR –	Odds Ratio
pb –	Pares de base
PBS –	Tampão fosfato (Phosphate Buffer Saline)
PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP –	Restriction Fragment Length Polymorphism
pH –	Potencial hidrogênio iônico
pmol –	Picomol
PPLO –	Pleuropneumonia-like Organisms
qPCR –	PCR quantitativa ou PCR em tempo real
r^2 –	R da curva
rpm –	Rotações por minuto
rRNA –	RNA ribossômico
SC –	Small Colony
s –	Segundo
SNP –	Single Nucleotide Polimorphism
T –	Timina
TCLE –	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF –	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α –	Fator de Necrose Tumoral alfa
TT –	Homozigoto TT
U –	unidade
UBS –	Unidades Básicas de Saúde
UFC/ μ L –	Unidade Formadora de Colônia por microlitro
UNG –	Uretrite não gonocócica
USF –	Unidade de Saúde da Família
VB –	Vaginose Bacteriana
X –	Veze
α –	Alfa
β –	Beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Colônia de <i>M. hominis</i> em meio SP4 com sua característica forma de “ovo frito” (aumento 40X).....	36
Figura 2 –	Célula de <i>M. genitalium</i> (G-37), não fixada e negativamente corada (x 750 000).....	39
Figura 3 –	<i>M. penetrans</i> (GTU-54) aderido à superfície de uma célula humana endotelial.....	41
Figura 4 –	Mapa do grupo de genes de IL-1 no cromossomo 2 (sem escala).....	47
Figura 5 –	Mapa da região regulatória do gene IL-6 e possível mecanismo regulador da expressão deste.....	49
Figura 6 –	Gráficos gerados a partir da reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão utilizada nos testes para a espécie <i>M. genitalium</i>	60
Figura 7 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR utilizando “primers” GPO3 e MGSO com DNA das amostras coletadas e das cepas de referência de <i>M. penetrans</i> , <i>M. hominis</i> e <i>M. genitalium</i>	65
Figura 8 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR utilizando “primers” M1 e M2 com DNA das amostras coletadas e da cepa de referência de <i>M. hominis</i> ATCC 23114 (PG-21).....	66
Figura 9 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR utilizando “primers” MG16-45F e MG16-447RR com DNA das amostras coletadas e da cepa de referência de <i>M. genitalium</i> ATCC 33530 (G37).....	66
Figura 10 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR utilizando “primers” IMM-7 MP e IMM-5 MP com DNA das amostras coletadas e da cepa de referência de <i>M. penetrans</i> ATCC 55252 (GTU 54).....	67
Figura 11 –	Quantificação por qPCR, de <i>M. hominis</i> e <i>M. genitalium</i> (UFC/μl) a partir das amostras de swab vaginal, nos grupos caso e controle.....	68
Figura 12 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR, da região gênica onde ocorre a mutação pontual, utilizando “primers” P1 e P2 com DNA das amostras de sangue coletadas das mulheres.....	89
Figura 13 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR-RFLP evidenciando três perfis de polimorfismos genéticos da região gênica onde ocorre a mutação pontual na citocina IL-1β.....	90
Figura 14 –	Eletroforese em gel de agarose dos produtos da MS-PCR evidenciando três perfis de polimorfismos genéticos da região gênica onde ocorre a mutação pontual na citocina IL-6.....	91
Figura 15 –	Eletroesferograma parcial da reação de sequenciamento dos fragmentos dos genes IL-6 e IL-1B evidenciando as regiões dos polimorfismos c – 174 C>G e c + 3954 C>T.....	92
Figura 16 –	Figura 16 Quantificação de IL-1β e IL-6 (pg/mL) no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos caso e controle de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	99
Figura 17 –	Quantificação de IL-1β e IL-6 no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos qPCR-positivo e negativo para <i>M. hominis</i> , e nos grupos caso e controle qPCR-positivo para <i>M. hominis</i> de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	100

Figura 18 –	Quantificação de IL-1 β e IL-6 no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos qPCR-positivo e negativo para <i>M. genitalium</i> , e nos grupos caso e controle qPCR-positivo para <i>M. genitalium</i> de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	101
Figura 19 –	Quantificação de IL-1 β e IL-6 no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos caso e controle e sua relação com o perfil genotípico dos polimorfismos associados às citocinas encontrados em mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para Mollicutes e peso molecular do produto amplificado.....	54
Quadro 2 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para <i>M. hominis</i> e peso molecular do produto amplificado.....	55
Quadro 3 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para <i>M. genitalium</i> e peso molecular do produto amplificado.....	55
Quadro 4 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para <i>M. penetrans</i> e peso molecular do produto amplificado.....	56
Quadro 5 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	56
Quadro 6 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i>	57
Quadro 7 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de <i>Gardnerella vaginalis</i>	58
Quadro 8 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i>	58
Quadro 9 –	Sequências dos iniciadores utilizados para detecção de polimorfismo monogenético na região -174 do cromossomo que codifica a IL-6 e peso molecular do produto amplificado.....	61
Quadro 10 –	Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica em que ocorre mutação monogênica para IL-1 β e peso molecular do produto amplificado.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Perfil de detecção de Mollicutes, <i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> e <i>M. penetrans</i> , por meio da PCR convencional, em amostras de swab vaginal de mulheres atendidas em Unidades de Saúde de Vitória da Conquista - BA, 2011.....	64
Tabela 2 –	Perfil de detecção de <i>M. hominis</i> e <i>M. genitalium</i> , por meio da qPCR, em amostras de swab vaginal de mulheres atendidas em Unidades de Saúde de Vitória da Conquista - BA, 2011.....	67
Tabela 3 –	Perfil de detecção de diferentes microorganismos de importância ginecológica em amostras de swab vaginal testadas por meio da PCR convencional, em mulheres atendidas em Unidades de Saúde de Vitória da Conquista - Ba, 2011.....	69
Tabela 4 –	Perfil das mulheres com amostras de swab vaginal com resultado de PCR e qPCR positivo para Mollicutes, <i>M. hominis</i> e <i>M. genitalium</i> , atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista - BA, 2011.....	71
Tabela 5 –	Detecção de Mollicutes por meio da PCR convencional em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	73
Tabela 6 –	Detecção de <i>M. hominis</i> por meio da PCR convencional em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	76
Tabela 7 –	Detecção de <i>M. hominis</i> por meio da PCR em tempo real (qPCR) em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	78
Tabela 8 –	Detecção de <i>M. genitalium</i> por meio da PCR em tempo real (qPCR), em amostras de swab vaginal, e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	81
Tabela 9 –	Perfil das mulheres com e sem sinais e/ou sintomas em relação à presença de Mollicutes, <i>M. hominis</i> ou <i>M. genitalium</i> detectados por PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR) em amostras de swab vaginal de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	83
Tabela 10 –	Perfil clínico-demográfico das mulheres com e sem sinais e/ou sintomas de infecção urogenital atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	84
Tabela 11 –	Associações das variáveis com a detecção de Mollicutes, <i>M. hominis</i> , <i>M. genitalium</i> e sinais e sintomas em mulheres atendidas em postos de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011, preditos por regressão logística, N = 302.....	87
Tabela 12 –	Frequência dos genótipos das interleucinas IL-6 e IL-1 β para seus respectivos polimorfismos encontrados em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	92
Tabela 13 –	Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a detecção de <i>M. hominis</i> por meio da PCR convencional e PCR em tempo real, em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	94
Tabela 14 –	Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a detecção de <i>M. genitalium</i> por meio da PCR convencional e PCR em tempo real, em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	95

Tabela 15 –	Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a detecção de <i>T. vaginalis</i> e <i>N. gonorrhoeae</i> por meio da PCR convencional em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	96
Tabela 16 –	Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a detecção de <i>G. vaginalis</i> e <i>C. trachomatis</i> por meio da PCR convencional em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	97
Tabela 17 –	Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a presença de sinais e/ou sintomas clínicos reportados ou evidenciados em mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.....	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
2.1 Infecções Sexualmente Transmissíveis.....	27
2.2 Microrganismos envolvidos nas Infecções Sexualmente Transmissíveis.....	29
2.2.1 Características gerais dos mollicutes.....	29
2.2.1.1 <i>Mycoplasma hominis</i>	35
2.2.1.2 <i>Mycoplasma genitalium</i>	38
2.2.1.3 <i>Mycoplasma penetrans</i>	40
2.2.2 Outros microrganismos de importância ginecológica.....	42
2.2.2.1 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (gonococos).....	42
2.2.2.2 <i>Chlamydia trachomatis</i>	43
2.2.2.3 <i>Trichomonas vaginalis</i>	44
2.2.2.4 <i>Gardnerella vaginalis</i>	45
2.3 Polimorfismos de citocinas.....	45
2.3.1 <i>Interleucina-1β</i> (IL-1 β).....	46
2.3.2 <i>Interleucina-6</i> (IL-6).....	48
3 OBJETIVOS.....	50
3.1 Objetivos gerais.....	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Procedimento de coleta das amostras.....	51
4.2 Padronização das cepas utilizadas.....	52
4.3 Extração de DNA das amostras de swab vaginal.....	53
4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional.....	53
4.4.1 PCR para a detecção de <i>Mollicutes</i>	54
4.4.2 PCR para detecção da espécie <i>M. hominis</i>	54
4.4.3 PCR para detecção da espécie <i>M. genitalium</i>	55
4.4.4 PCR para detecção da espécie <i>M. penetrans</i>	55
4.4.5 PCR para detecção de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	56
4.4.6 PCR para detecção de <i>Chlamydia trachomatis</i>	57

4.4.7 PCR para detecção de <i>Gardnerella vaginalis</i>.....	57
4.4.8 PCR para detecção de <i>Trichomonas vaginalis</i>.....	58
4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa.....	58
4.5.1 PCR quantitativo para a detecção de <i>M. hominis</i>.....	59
4.5.2 PCR quantitativo para a detecção de <i>M. genitalium</i>.....	59
4.5.3 Análise dos dados da PCR quantitativa.....	59
4.6 Análise do polimorfismo de citocinas.....	60
4.6.1 Extração de DNA das amostras de sangue.....	60
4.6.2 MS-PCR para detecção do polimorfismo monogenético na citocina IL-6.....	60
4.6.3 PCR RFLP para detecção do polimorfismo no gene IL-1B.....	61
4.6.4 Confirmação do polimorfismo genético dos genes IL-1B e IL-6 por sequenciamento.....	62
4.7 Dosagem das citocinas IL-1β e IL-6 no soros das mulheres.....	63
4.8 Análise estatística.....	63
5 RESULTADOS.....	64
5.1 PCR convencional para a detecção de micoplasmas.....	64
5.2 PCR quantitativo (qPCR) para a detecção de micoplasmas.....	67
5.3 PCR convencional para a detecção de outros microrganismos de importância ginecológica.....	68
5.4 Análise do perfil demográfico das mulheres atendidas em relação aos resultados obtidos nas PCRs convencionais e quantitativas.....	69
5.4.1 Detecção de <i>Mollicutes</i>, <i>M. hominis</i> e <i>M. genitalium</i> por meio da PCR e qPCR e a distribuição dos micoplasmas na população estudada.....	69
5.4.2 Perfil clínico-demográfico da população testada para a presença de molicutes nas amostras de swab genital.....	70
5.4.3 Perfil clínico-demográfico da população estudada para a presença de <i>M. hominis</i> nas amostras de swab genital testadas por meio da PCR convencional.....	75

5.4.4 Perfil clínico-demográfico da população estudada para a presença de <i>M. hominis</i> nas amostras de swab genital testadas por meio da PCR quantitativa (qPCR).....	75
5.4.5 Perfil clínico-demográfico da população estudada para a presença de <i>M. genitalium</i> nas amostras de swab genital testadas por meio da PCR em tempo real (qPCR).....	80
5.4.6 Perfil das mulheres com ou sem sinais e/ou sintomas em relação à presença de <i>Mollicutes</i>, <i>M. hominis</i> ou <i>M. genitalium</i> detectados por PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR).....	80
5.4.7 Perfil clínico-demográfico das mulheres com e sem sinais e/ou sintomas.....	83
5.4.8 Análise Multivariada da detecção de <i>Mollicutes</i>, <i>M. hominis</i> e <i>M. genitalium</i> e sinais e sintomas nas mulheres atendidas.....	86
5.5 Análise dos polimorfismos genômico das citocinas.....	89
5.5.1 Detecção de polimorfismo genômico da Interleucina-1β (IL-1β) por meio da PCR RFLP.....	89
5.5.2 Detecção de polimorfismo genômico da Interleucina-6 (IL-6) por meio da MS-PCR.....	90
5.5.3 Perfil genotípico das interleucinas (IL-1β e IL-6) na população estudada e sua relação com a detecção dos diversos microrganismos por meio da PCR convencional e PCR em tempo real.....	93
5.5.4 Perfil genotípico das interleucinas (IL-1β e IL-6) na população estudada e sua relação com a presença ou ausência de sinais e sintomas relatados.....	93
5.6 Dosagem das citocinas no soro das mulheres analisadas.....	99
5.6.1 Análise das citocinas em relação aos dados clínicos e detecção de micoplasmas.....	99
5.6.2 Relação da concentração das citocinas IL-1β e IL-6 e os diferentes perfis genômicos encontrados no estudo dos polimorfismos associados.....	102
6 DISCUSSÃO.....	103
7 CONCLUSOES.....	115

REFERÊNCIAS.....	117
APÊNDICE A – Questionário.....	137

1 INTRODUÇÃO

O termo *Mycoplasma* é usado, informalmente, para designar os microrganismos da Classe *Mollicutes* (Mollis = mole; cútis = pele) (RAZIN, 1992). Os mollicutes possuem um genoma pequeno, sendo que algumas espécies apresentam o menor genoma entre os procariotos e, em consequência, apresentam metabolismo reduzido (MILES; NICHOLAS, 1998). Com aproximadamente 200 espécies estes microrganismos são encontrados em plantas, insetos, animais e o homem (DYBVIIG; VOELKER 1996; RAZIN, 1992).

Diversos mollicutes são apontados como constituintes da microbiota normal de indivíduos saudáveis. Entretanto, algumas espécies também foram associadas a infecções urogenitais, dificultando a compreensão do papel destas espécies. Os resultados dos estudos da relação parasito-hospedeiro justificam em parte, o potencial patogênico destas bactérias (CHERNOV, 2011; KRAUSE, 1992; ROSENGARTEN, 2000). Até o momento a ocorrência de 17 espécies de mollicutes foram relatadas em humanos como hospedeiro primário (PITCHER, 2005; WAITES, 2005). Incluem-se neste contexto: *M. spermatophilum*, *M. primum*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. penetrans*, *M. fermentans* e *U. urealyticum*, sendo estas as principais espécies isoladas do trato urogenital (DOMINGUES, 2005).

Há cinco décadas estas bactérias foram incluídas entre os agentes infecciosos causadores de doenças urogenitais em humanos (KRAUSE, 1992). Mesmo assim, a infecção e a distribuição por estes agentes em diversos grupos populacionais ainda é pouco conhecida (CORDOVA; CUNHA, 2002). A etiologia de *M. hominis* e ureaplasmas nas vaginoses bacterianas, e principalmente *U. urealyticum* e *U. parvum* nas uretrites não-gonocócicas em homens, foram melhor estudados e portanto estão melhor associados com estas doenças. Entretanto, *M. genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans*, ainda desafiam a sua compreensão quanto à sua associação nas infecções urogenitais (CORDOVA; CUNHA, 2002; PATEL; NYIRIESY, 2010).

Apesar da dificuldade de correlacionar o isolamento de *M. hominis* em amostras do trato urogenital e estabelecer a etiologia das infecções neste sítio anatômico, a detecção deste microrganismo, associado a diferentes populações também é importante, pela ocorrência de doenças crônicas e agudas incluindo-se a transmissão vertical (AVELAR et al., 2007). *M. hominis* é um dos causadores de

uretrite não-gonogócica (UNG) e vaginose bacteriana (VB), associado à febre pós-aborto e pós-parto (KOCH et al., 1997). De forma incomum, *M. hominis* causa bacteremia (PEDRAZA; ORTIZ, 1998), artrite (POGGIO et al., 1998), peritonite (MIETTINEN, 1987) e meningite (WOLTHERS et al., 2003).

Por sua vez, *M. genitalium* foi identificado como um possível agente etiológico de UNG e uretrite não clamidial (UNO et al., 1997). Esta espécie também tem sido detectada em amostras cervicais de pacientes com salpingite, (COHEN; MUGO; ASTETE, 2005) e no colo do útero e endométrio de pacientes com endometrite (COHEN; MANHART; BUKUS, 2002). Outros estudos apontam ainda uma forte associação entre *M. genitalium* e a ocorrência de cervicite em mulheres (JENSEN, 2004) e endometrite aguda (COHEN; MANHART; BUKUS, 2002).

M. penetrans tem sido encontrado em pacientes com AIDS e/ou em indivíduos HIV-positivos, possibilitando associação deste mollicute com a doença retroviral (CORDOVA; BLANCHARD; CUNHA, 2000; CORDOVA; CUNHA, 2002). A frequência aumentada de *M. penetrans* em pacientes HIV-positivos comparada com pacientes HIV-negativos também é reportada (HUSSAIN et al., 1999). A espécie apresenta-se primariamente como microrganismo intracelular (TAYLOR-ROBINSON, 1991), provocando sinais e sintomas de infecção sistêmica. Esta situação sugere proteção contra anticorpos e antibióticos, contribuindo com a cronicidade das infecções. Além disso, tem sido demonstrada uma complexa relação destas bactérias com o sistema imune (BASEMAN; TULLY, 1997).

As citocinas são proteínas de aproximadamente 25 kDa liberadas por algumas células imunocompetentes normalmente em resposta ao estímulo de receptores específicos. Algumas são suficientemente estáveis para atuar de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isto dependa da capacidade de atingir a circulação e de sua meia-vida sanguínea (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2010).

Neste contexto, alguns estudos relacionam os polimorfismos de citocinas com a presença de microrganismos e as VB. Jeremias et al. (1999) associaram o polimorfismo do receptor da citocina IL-1, principalmente em relação à presença de *U. urealyticum* e *M. hominis*. Cauci et al. (2007) também encontraram uma associação forte entre os polimorfismos dos receptores de citocinas IL-1 α e IL-1 β com a presença de vaginoses bacterianas.

A melhor compreensão da biologia dos mollicutes estudados caracteriza-os melhor como agentes oportunistas e por sua vez, têm aberto novos horizontes na micoplasmologia humana. Deste modo, o objetivo do presente estudo é investigar a presença das espécies *M. genitalium*, *M. hominis* e *M. penetrans*, numa população do semiárido baiano e sua frequência relacionada ao histórico e hábitos sexuais do grupo estudado, bem como ao polimorfismo das citocinas IL-1 β e IL-6.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecções Sexualmente Transmissíveis

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) são infecções obtidas primariamente pelo contato sexual. Nas últimas duas décadas, estas enfermidades passaram por alterações. Inicialmente, na terminologia, ao passar de Doenças Venéreas (DV) para Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) e, mais recentemente, para ISTs. Em seguida, na importância e atenção dada, não apenas aos microrganismos sexualmente transmitidos, mas também às síndromes associadas às ISTs (MALLA, 2012).

Atualmente, as ISTs estão entre os maiores problemas de saúde pública no mundo. Estima-se que nos países em desenvolvimento estas doenças estejam entre as cinco causas mais frequentes de busca por serviços de saúde. De acordo com o Ministério da Saúde, ocorre um novo caso de IST a cada 100 pessoas por ano nos países industrializados (AGUIAR; AGUIAR, 2009; BRASIL, 2008; MEHEUS, 1991). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que ocorram 340 milhões de novos casos de ISTs por ano em pessoas de 15 a 49 anos, dos quais, 10 a 12 milhões somente no Brasil (AGUIAR, 2009; BRASIL, 2008).

De acordo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*/EUA – CDC), ocorrem aproximadamente 19 milhões de novos casos de ISTs por ano nos Estados Unidos e cerca de 50 são indivíduos entre 15 e 24 anos. Estima-se que neste contexto, são gastos 13,5 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos (BARCLAY, 2009). No Brasil, as IST que fazem parte da lista nacional de doenças de notificação compulsória compreendem apenas os casos de síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), de gestantes portadoras do vírus HIV ou sífilis e crianças expostas ao HIV ou com sífilis congênita; praticamente inexistem dados de incidência de outras ISTs em nível nacional (AGUIAR, 2009; BRASIL, 2008; LOPES, 2006).

Os poucos dados epidemiológicos, quando disponíveis, evidenciam a magnitude do problema de saúde pública que constitui as ISTs no Brasil e no mundo. Contudo, apesar das consequências sócio-econômicas negativas, muitos governantes tendiam a negligenciar este problema (MEHEUS, 1991). Sabe-se que uma doença sexualmente transmissível aumenta o risco de ISTs adicionais, uma vez

que os fatores de riscos são os mesmos e, não raramente, ocorrem casos de coinfeção. Com base nisto, o Ministério da Saúde nos últimos anos tem recomendando maior atenção às ISTs, especialmente no contexto da vigilância epidemiológica, com vistas em reduzir agravos e custos para a economia do país (AGUIAR, 2009).

A vulnerabilidade dos diferentes segmentos populacionais só pode ser compreendida quando levado em conta aspectos agrupados nas esferas individual, institucional e social. Dentre estes aspectos, problemas como escassez de dados epidemiológicos, baixa acessibilidade, resolutividade e a insuficiência dos serviços de saúde perfazem problemas institucionais (AGUIAR, 2009; NARCHI; JANICAS; FERNANDES, 2007). No plano social, a vulnerabilidade abrange aspectos econômicos, coletivos e políticos como: violência, pobreza, evasão escolar e desigualdade de gênero; dificultando assim, o exercício efetivo da cidadania. Na perspectiva individual, a vulnerabilidade está relacionada à capacidade de cada indivíduo processar informações sobre sexualidade, serviços de saúde e aspectos comportamentais (BRASIL, 2011; NARCHI; JANICAS; FERNANDES, 2007).

Neste sentido, é importante ressaltar que a história de um indivíduo está imersa em determinado contexto familiar, cultural e social que dá significado e constitui as características pessoais. Assim, a diminuição da vulnerabilidade depende diretamente da atuação dos serviços de saúde frente a esta problemática, e tem o profissional de saúde como ator que deve manter-se atualizado sobre o tema e procurar promover atividades de educação para a saúde que conduzam mudanças de comportamento e práticas preventivas ao mesmo tempo em que reduzam o preconceito e a falta de informação (BRASIL, 2011; LOPES, 2006; NARCHI; JANICAS; FERNANDES, 2007).

O atendimento de um usuário do serviço portador de IST não constitui apenas uma ação curativa; é também uma ação preventiva da transmissão e do surgimento de outras complicações. A espera em longas filas, reagendamentos, a discriminação e a falta de medicamentos são fatores que induzem a busca de resolução fora do sistema formal de saúde. O desaparecimento dos sintomas pode desestimular a busca por tratamento, permitir a evolução de quadros clínicos de infecção para formas crônicas graves e perpetuar a cadeia de transmissão. Com base nisto, a OMS recomenda a abordagem sindrômica de ISTs em pacientes apresentando sinais e/ou sintomas consistentes e reconhecíveis com base em fluxogramas que

podem ser utilizados em Unidades Básicas de Saúde (UBSs) (BRASIL, 2005; WHO, 2007).

O Ministério da Saúde também preconiza a utilização dos fluxogramas pelos profissionais que, apoiados pelo instrumento, estariam habilitados a determinar um diagnóstico de uma síndrome não descartando, contudo, exame clínico e genital minuciosos (BRASIL, 2005; LOPES, 2006; TROLLOPE-KUMAR; GUYATT, 2006). Opiniões contrárias à adoção da abordagem sindrômica ampliam a discussão em torno do tema sob o argumento de que, em muitos contextos de atenção primária à saúde, os profissionais de saúde não teriam treinamento e equipamentos para realizar o atendimento e diagnósticos. Além disso, prescrições inadequadas de antibióticos acentuariam a resistência microbiana e gerariam ônus desnecessários em países emergentes (GUYATT, 2006; TROLLOPE-KUMAR; GUYATT, 2006). Em contrapartida, apesar de reconhecer as limitações do modelo de atenção, a OMS alega que os benefícios gerados justificam a abordagem em todas as configurações (WHO, 2007).

2.2 Microrganismos envolvidos nas Infecções Sexualmente Transmissíveis

Estão envolvidos nas ISTs vírus, fungos, bactérias, protozoários e parasitas. Como consequência destas infecções, podem ocorrer lesões, secreções, corrimentos, verrugas e vesículas (AGUIAR; AGUIAR, 2009). Os micoplasmas (molicutes) fazem parte deste contexto de maneira diferenciada. Estas bactérias são encontradas em indivíduos sadios e usualmente em maior quantidade naqueles com algum distúrbio das mucosas urogenitais, mais especificamente uretrites, vaginites e vaginoses (LOPES, 2006).

2.2.1 Características gerais dos molicutes

O primeiro relato de micoplasmas (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC, o agente da pleuropneumonia bovina) foi feito por Nocard e Roux (1898). No decorrer do tempo, microrganismos semelhantes, isolados de humanos e de animais, foram descritos por outros pesquisadores e denominados de PPLO – (*pleuropneumonia-like organisms*). Atualmente, estes recebem a denominação proposta por Edward e Freundt (1956): Micoplasmas. Taxonomicamente, a ausência

completa da parede celular separa os micoplasmas de outras bactérias em uma classe denominada Mollicutes (*mollis*: mole; *cutis*: pele, em latim) (ATLAS, 1995; RAZIN, 1983C). Atualmente são reconhecidas cinco ordens (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* e *Incertae sedis*), seis famílias (*Mycoplasmataceae*, *Entomoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae*, *Acholeplasmataceae*, *Anaeroplasmataceae* e *Erysipelothrichaceae*) e 14 gêneros (*Mycoplasma*, *Eperythozoon*, *Haemobartonella*, *Ureaplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, *Spiroplasma*, *Acholeaplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroplasma*, *Erysipelothrix*, *Bulleidia*, *Holdemania* e *Solobacterium*) (BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 2001; RAZIN, 1992). Apesar de usuais, termos como micoplasmas ou mollicutes tem sido utilizados indiferenciadamente pelos autores para denotar qualquer espécie dentre os Mollicutes (RAZIN, 1995).

Os mollicutes possuem um genoma pequeno e, consequentemente, o seu metabolismo é reduzido, sendo que a espécie *Mycoplasma genitalium* apresenta genoma de 580 Kpb, sendo o menor genoma entre os procariotos. São considerados os menores organismos capazes de autorreplicação (BOVÉ, 1999; RAZIN, 1995). Filogeneticamente, com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, são relacionados às bactérias gram-positivas com baixa porcentagem de guanina (G) e citosina (C). Por um processo de evolução reductiva do seu genoma pelas adaptações nos seus nichos, desenvolveram características fenotípicas e metabólicas diferenciadas (PERRY; STALEY, 1997). O tamanho do genoma divide estas bactérias em dois grupos; um composto pelos gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, com aproximadamente 580 a 1350 Kpb, e o outro pelos gêneros *Acholeaplasma*, *Spiroplasma* e *Anaeroplasma* com 790 a 2200 Kpb (MILES; NICHOLAS, 1998).

Os micoplasmas são altamente pleomórficos por não possuírem parede celular e poderem produzir filamentos que se assemelham aos fungos (*mykes*: fungo e *plasma*: formação). Estas bactérias possuem dimensões entre 0,1 a 0,25 μm e ao microscópio eletrônico, apresentam formas helicoidais, esféricas ou periformes, com ou sem filamentos. Os filamentos ocorrem pela disincronia da divisão celular mais rápida do que a replicação genômica. Quando ambos mecanismos se completam formam-se os "brotamentos" que são pequenas células independentes e viáveis. Os micoplasmas não possuem flagelos, mas algumas espécies exibem motilidade por deslizamento em superfície de plástico ou vidro. Estas espécies

normalmente apresentam uma organela ou estrutura especializada na extremidade da célula que desempenha um papel na adesão às células hospedeiras. Devido a seu tamanho e maleabilidade, os micoplasmas transpõem usualmente os filtros retentores da maioria das bactérias e no passado acreditou-se inicialmente que estes organismos fossem vírus (RAZIN, 1995).

As colônias apresentam de 50 a 500 μm de diâmetro e possuem a usualmente a morfologia semelhante a um “ovo frito”. Apresentam uma zona central opaca e granular incorporada no ágar e ao redor, uma zona plana e translúcida na superfície do meio sólido. A aparência das colônias é depende das condições de crescimento, idade da cultura e da concentração do ágar. Poucas espécies não apresentam as colônias em forma “ovo frito” sob quaisquer condições de cultivo. Em meio líquido, o crescimento geralmente não causa turvação, provocando a alteração de cor no caldo revelado por um indicador de alteração de pH. Neste sentido, apesar de a coloração de Gram não permitir a identificação por não apresentarem parede celular, esta técnica serve para evidenciar a contaminação por outras bactérias nos caldos de cultivo (RAZIN, 1983B; RAZIN, 1995).

Na caracterização morfológica dos micoplasmas, a microscopia óptica apresenta-se como técnica utilizada na visualização de estruturas mais grosseiras. A microscopia eletrônica, por sua vez, permite a visualização detalhada da ultraestrutura destes microrganismos e desta forma, a demonstração de uma membrana em finas secções; requisito para a identificação de um novo isolado como mollicutes (MARTINEZ; TADDEI, 2008; RAZIN, 1983A).

Os micoplasmas são encontrados em humanos, mamíferos, reptéis, peixes, artrópodes e plantas. Novas espécies de hospedeiros e de Mollicutes são frequentemente mencionados na literatura (HORNOK et al., 2012; ISO et al., 2013; LO et al., 2001; MAGGI et al., 2013; NETO, 2007; RAZIN, 1992; VOLOKHOV et al., 2011). Micoplasmas usualmente exibem uma relação estrita e específica com o tecido do seu hospedeiro, provavelmente por conta do modo de vida parasitário e por serem nutricionalmente exigentes. Entretanto, como observado por Goulet et al. (1995) existem variações e eventualmente é possível isolar espécies de sítios e hospedeiros diferentes daqueles habituais. *M. pneumoniae* pode encontrado preferencialmente no trato respiratório, e *M. genitalium* tem sido isolado do trato urogenital, mas o contrário também pode ocorrer. *M. salivarum* foi isolado da secreção nasal e orofaríngea de suínos, mesmo este sendo comumente encontrado

na cavidade bucal humana. *Acholeplasma oculi*, um micoplasma que foi detectado em vários animais, foi isolado de líquido amniótico de uma mulher. Apesar dos relatos, o mecanismo de indução da susceptibilidade do hospedeiro a micoplasmas incomuns ainda é incerto (ERICKSON; ROSS; BOVE, 1988; RAZIN, 1992; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; WAITES et al., 1987).

O isolamento de mollicutes de amostras clínicas depende de várias condições clínicas dos hospedeiros e do material obtido. A presença de anticorpos, antibióticos ou de componentes tóxicos e inibidores nos materiais clínicos contribuem prejudicando o desenvolvimento “in vitro” destas bactérias. Além disto, incluem-se a qualidade dos meios de cultura e condições de incubação. Mesmo assim, algumas espécies são muito difíceis de serem recuperadas dos materiais clínicos. Desta maneira, as técnicas de biologia molecular são cada vez mais utilizadas como metodologias alternativas e valiosas no estudo destas bactérias fastidiosas (AMIRMOZAFARI et al., 2009; BALABANOV et al., 2006; TULLY, 1995).

O meio de cultura para micoplasmas basicamente contém peptona, aminoácidos, infusão de carne bovina, soro animal, DNA, extrato fresco de levedura, glicose e/ou arginina e uréia (para ureaplasma). Quando são isolados de materiais clínicos, adicionam-se impedimentos aos meios de cultura contra microrganismos contaminantes. Assim, incluem-se usualmente penicilina, acetato de tálio e antifúngicos. Algumas espécies de Mollicutes requerem co-fatores complexos. Também deve ser considerada a alteração de pH pelo crescimento destas bactérias, pela produção de compostos do metabolismo primário em caldo e o esgotamento de nutrientes essenciais, podendo ser fatores estressantes prejudicando os subcultivos ou mesmo inviabilizando a multiplicação (MILLES, 1992; RODWELL, 1983; TULLY, 1985).

A maioria dos mollicutes são facultativos, e geralmente preferem atmosfera com pouco oxigênio, principalmente no primocultivo. O gênero *Anaeroplasma* e *Asteroleplasma* constituem-se de poucas das espécies que são anaeróbios estritos. Somente poucas espécies de *Mycoplasma*, como *M. hyorhinis*, requerem atmosfera anaeróbica, sendo que a aeração pode contribuir para o crescimento de algumas espécies, presumivelmente, por contribuir na produção de ATP gerado durante o metabolismo da glicose e outros carboidratos (KOTANI et al., 1990; MILES, 1992; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; RODWELL, 1983; TULLY, 1985).

A maioria dos Mollicutes isolados do homem e de animais exibem temperatura ótima de crescimento de 36 °C a 38 °C, enquanto que acholeplasmas podem se multiplicar em temperatura ideal igual ou abaixo de 22 °C (TULLY, 1985). Mollicutes geralmente sobrevivem em uma faixa estreita de intervalo de pH. Para espécies originárias de plantas e vertebrados, o pH ótimo é de 7,4 e o crescimento ocorre entre pH 6,5 a 8,0. Os ureplasmas são exceções, sendo o pH ótimo de 6,0 a 6,5, sendo seu crescimento inibido em pH acima de 7,5 (MILES, 1992; RAZIN et al., 1977).

A pressão osmótica ideal durante o crescimento de algumas espécies de *Mycoplasma* e para *Acholeplasma laidlawii*, em meio líquido ou sólido, foi próximo a 10 atm (LEACH, 1962). Contudo, variações entre os diferentes gêneros e espécies, podem atingir valores de 6,5 a 32 atm, como no caso dos *Spiroplasmas*. Desta forma, o estabelecimento da osmolaridade constitui um ponto crítico para o crescimento dos mollicutes e, portanto, para os estudos incluindo isolamento e nutrição destes microrganismos. Além disso, é válido ressaltar que a pressão osmótica do meio pode aumentar durante o crescimento, como uma consequência do metabolismo (MILES, 1992).

A maioria dos mollicutes vivem como comensais, e em muitos artrópodes podem mesmo ser considerados simbiossiontes. Infecções com micoplasmas patogênicos são raramente agudas e usualmente seguem um curso crônico (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Os mollicutes, principalmente as espécies encontradas em mamíferos, apresentam-se como "parasitas ideais", geralmente vivendo em harmonia com seu hospedeiro, mas, por outro lado, são também considerados como "oportunistas ideais". Diversas doenças nos seus respectivos hospedeiros são causadas ou associadas aos Mollicutes (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). Estas bactéria parecem preferir estabelecerem-se em nichos com células em constante renovação favorecendo a sua adesão (GABRIDGE; CHANDLER; DANIELS, 1985).

A base molecular da patogenicidade dos micoplasma permanece pouco esclarecida. Todavia, o quadro clínico das infecções por micoplasma em humanos e animais é mais sugestiva do efeito da modulação da resposta imunológica e inflamatória do hospedeiro do que pelos efeitos tóxicos de componentes gerados pelos microrganismos (GABRIDGE; CHANDLER; DANIELS, 1985; RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998; TRYON; BASEMAN, 1992).

Propriedades biológicas dos micoplasmas têm sido relacionadas como determinantes de virulência. Estas incluem: 1) a geração de peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido por micoplasmas aderentes, os quais induzem o stress oxidativo, incluindo dano à membrana da célula hospedeira; 2) competição por nutrientes ou precursores biossintéticos, interferindo no metabolismo da célula hospedeira e sua função; 3) existência de glicocálix ou estruturas eletrodensas na superfície da bactéria com propriedades imunomoduladoras 4) alta frequência de variação de fase que resulta na diversidade antigênica na superfície bacteriana possibilitando a modificação da resposta imune do hospedeiro; 5) secreção ou introdução de enzimas bacterianas como: fosfolipases, ATPases, hemolisinas, proteases e nucleases para o interior da célula hospedeira, causando aberrações cromossômicas e desorganização da função tissular e 6) permanência intracelular dificultando a ação de antibióticos e dos mecanismos de resposta imune contribuindo na cronicidade das doenças (GABRIDGE; CHANDLER; DANIELS, 1985; KRAUSE et al., 1992; TRYON; BASEMAN, 1992).

Os mollicutes apresentam afinidade pela membrana plasmática das células não fibroblásticas, linfócitos e, especialmente, às células epiteliais. Foram associados também aos efeitos inibitórios e/ou mitogênicos sobre linfócitos B e T, estímulo de células *Natural Killers* (NK) e aumento na produção das citocinas IL-6, IL-1 α e IL-1 β e IL-2 (MCGARRITY; KOTANI; BUTLER, 1992).

Há mais de 50 anos associou-se a etiologia de *M. pneumoniae* com a pneumonia atípica humana e *U. urealyticum* com a uretrite não gonocócica (UNG). No entanto, outras espécies de micoplasmas foram identificadas como parte da microbiota humana. Apesar da ocorrência de diversos esclarecimentos na biologia destas bactérias em humanos, existe pouco conhecimento do papel destas bactérias quando são comensais ou quando causam doenças (KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992).

Este aspecto continua indefinido em algumas doenças humanas envolvendo *M. hominis*, *M. genitalium* e *U. urealyticum* nos abortos espontâneos e neonatos de baixo peso ao nascer. *M. penetrans* que foi considerado como possível co-fator da AIDS. Clamídias e micoplasmas são os principais agentes das UNG e são encontrados com frequência no trato urogenital de indivíduos saudáveis. O efeito de um agente sobre o outro é também desafiador ao conhecimento da biologia destas bactérias. As inter-relações entre as espécies podem ocorrer nos diferentes

contextos, como nas culturas celulares, em estudos com modelos animais e na situação clínica (TAYLOR-ROBINSON, 1985).

Apesar das dificuldades de se correlacionar o resultado do isolamento de micoplasmas em amostras genitais e a etiologia de infecções neste sítio anatômico, a detecção destes microrganismos é de extrema importância. Esta relevância se dá por estes agentes estarem envolvidos em doenças como as vaginoses e uretrites, levando-se em conta os desconfortos gerados, as possíveis complicações conseqüentes destes distúrbios e a possibilidade de transmissão sexual. Desta forma, assumem papel importante ao constituir um problema de saúde pública, que necessita de cuidados médicos e tratamentos adequados, mesmo quando envolvidos em doenças consideradas de menor gravidade (AVELAR et al., 2007).

2.2.1.1 *Mycoplasma hominis*

O primeiro relato de isolamento de um micoplasma em humano foi em 1937. O microrganismo foi coletado em cultura pura, de um abscesso do ducto das glândulas de Bartholin. Na época não havia sistema de identificação das espécies de *Mycoplasma*, mas acredita-se que tenha sido *M. hominis* pelo fato de que espécies que formam colônias grandes e são mais comumente encontradas no trato genital. As colônias de *M. hominis* em ágar apresentam a característica aparência de “ovo frito” com diâmetros de 0,2 a 0,3 μm (Figura 1) (DIENES; EDSALL, 1937; KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992).

M. hominis foi a denominação proposta para cepas que cresceram em meio semi-sólido, usualmente produzindo um crescimento granular marcante, mostrando uma fraca e variável redução de azul de metileno e ácidos a partir da glicose. Ao estudo da microestrutura, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, apresentaram membrana celular de tripla camada, ribossomos, material nuclear, formação de filamentos ramificados muito curtos e espaçados indicaram que a sua reprodução ocorre por fissão binária. Contudo, embora seja comum as formas em divisão terem tamanhos iguais, as células filamentosas ocasionalmente atingem um comprimento até 30 μm , talvez em resposta às condições de crescimento abaixo do ideal (KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992).

Figura 1 – Colônia de *M. hominis* em meio SP4 com sua característica forma de “ovo frito” (aumento 40X).

M. hominis utiliza arginina como fator de crescimento. A ausência de diversas enzimas da glicólise, normalmente presentes, reforça o argumento de que esta via de geração de energia tem uma baixa eficiência para esta espécie. O mecanismo mais aceito é o da via dihidrolase envolvendo as enzimas arginina diaminase, ornitina carbamoiltransferase e carbamate kinase. Uma segunda via que envolve a geração de ATP a partir de ADP por meio de duas enzimas, fosfato acetiltransferase e acetato kinase, também foi proposta. Contudo, estudos mais recentes mostraram que a via não gerava como produto final AcetilCoA. De qualquer forma, a presença do gene que codifica a acetato kinase desempenha papel importante na produção de ATP em *M. hominis*. Além disso, *M. hominis* não metaboliza ureia, fermenta glicose ou outros carboidratos. Também não produz fosfatase ou “filmes e manchas” no ágar, reduz sal tetrazolium, ou digere gelatina e caseína. A produção de peróxido por *M. hominis* é pequena, gerando apenas lise parcial de hemácias (alfa hemólise). Contudo, a produção de amônia faz elevar o pH do meio produzindo mudança de cor de amarelo para o rosa. Além disso, colônias de *M. hominis* não são capazes de realizar hemoadsorção (KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992; MUHLRADT et al., 1981; PEREYRE et al., 2009; TAYLOR-ROBINSON, 1985).

O genoma da cepa PG21 de *M. hominis* possui um único cromossomo circular com 665.445 bp com uma proporção de G + C de 27,1 %mol. Contém 537 possíveis sequências de DNA codificante e 14 pseudogenes. Um pequeno, mas completo, conjunto de 33 genes de tRNA foi identificado. Não foram encontradas sequências de inserção, transposons ou plasmídios endógenos no genoma.

Todavia, como o relato se baseou em uma cepa padrão, é válido registrar uma variação na proporção de G + C (27,3 a 33,7 %mol) e no tamanho do genoma (630 a 750 pb). Por este motivo, as cepas de *M. hominis* apresentam considerável polimorfismo demonstrando heterogeneidade (KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992; PEREYRE et al., 2009).

A patogênese de *M. hominis* envolve a adesão às células do hospedeiro com evidências de que proteínas de membrana são as responsáveis por isto. Além disso, os danos provocados por enzimas de membrana como fosfolipase e aminopeptidase ou pela produção de amônia também são possíveis fatores que contribuem na patogênese. A colonização experimental do trato genital de camundongos por *M. hominis* foi dependente do tratamento hormonal, sendo recuperados os microrganismos da maioria dos animais tratados com estradiol quando comparado com o grupo não tratado. O tratamento com progesterona evidenciou proteção não tendo sido observada a colonização em animais tratados (KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992).

O fato de *M. hominis* fazer parte da microbiota do trato urogenital dificulta a determinação do papel desta espécie nas doenças. Todavia, evidências indiretas refletem o potencial patogênico desta espécie, como manifestado em diversos estudos. Embora *M. hominis* ocorra com frequência no trato geniturinário inferior, tem sido isolado do trato urogenital superior em pacientes com sintomas de infecção aguda e pielonefrite em humanos. Quando se descobriu que *Gardnerella vaginalis* não era o único agente etiológico responsável pela vaginose bacteriana (VB), diversos pesquisadores começaram a investigar o possível papel de *M. hominis* (BAYRAKTAR et al., 2010; GUPTA et al., 2009; GUVEN et al., 2007; KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992).

Atualmente, é aceita a participação de *M. hominis* na VB, mas o seu papel neste processo patológico ainda é desconhecido. Existem também dúvidas sobre este micoplasma na sua usual associação com casos de doença inflamatória pélvica (DIP). Como existem indicações de que este tenha um papel patogênico primário em alguns casos de DIP aguda, parece razoável aceitar que atue de forma importante em casos de infertilidade relacionados à doença tubária. Contudo, esta participação ainda está pouco explicada. *M. hominis* também tem sido isolado também do líquido amniótico de mulheres que apresentavam corioamnionite e subsequentemente abortaram, possibilitando, desta maneira, a associação deste micoplasma com estes

eventos. Infecções extragenitais por *M. hominis* tem sido relatadas envolvendo septicemia, infecção em articulações, sistema nervoso central, respiratória e em feridas cirúrgicas (BAYRAKTAR et al., 2010; GUPTA et al., 2009; GUVEN et al., 2007; KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992).

2.2.1.2 *Mycoplasma genitalium*

Tully et al. (1981) isolaram pela primeira vez *M. genitalium* a partir de duas amostras de swab uretral de homens com UNG. Na ocasião, foi encontrado, nos esfregaços de amostra uretral, a presença de clamídia, ureaplasmas, *M. hominis*, e outro microrganismo que por vezes revelava motilidade em forma espiral. Após inocularem as amostras em meio SP4, recuperaram em cultura este último microrganismo.

M. genitalium predominantemente apresenta-se em forma de “garrafa” sendo a estrutura terminal envolvida na adesão às superfícies celulares (Figura 2). Possui entre 0,6 e 0,7 μm no comprimento, de 0,3 a 0,4 μm na largura da base e de 0,06 a 0,08 μm na extremidade. Ao microscópio eletrônico de transmissão, também evidenciou-se a membrana a membrana em tripla camada com 7,5 a 10 nm de largura sendo uma camada intermediária eletrodensa em relação às demais. A estrutura terminal promove a motilidade por deslizamento e muitas cepas se movem por meio de movimentos rotatórios em sentido horário. A velocidade de locomoção pode chegar a 0,1 $\mu\text{m/s}$ (KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992).

M. genitalium é capaz de metabolizar glicose, contudo, não metaboliza arginina ou ureia. Esta característica é utilizada na detecção em meio de cultura uma vez que a diminuição do pH contribui na identificação. A temperatura ótima de crescimento é de 37 °C, e as colônias se desenvolvem em atmosfera de nitrogênio com 5% de CO₂. Seu crescimento é inibido com a concentração de 0,05% de acetato de tálio. Além disso, não produz fosfatase ou filme e manchas no ágar, no entanto, reduz tetrazólio anaerobicamente e sua colônia exibe hemadsorção com eritrócitos de carneiro “in vitro”. O conteúdo de G + C do DNA é de 32,4 $\pm$ 1,0 mol/%. O genoma foi totalmente sequenciado por Fraser et al. (1995), e com aproximadamente 600 Kb esta espécie possui o menor genoma relatado de um organismo capaz de autorreplicação. Apesar da semelhança genética de 98% entre *M. genitalium* e *M. pneumoniae*, pesquisadores em diferentes estudos amplificaram

diferentes fragmentos da proteína de adesão MgPa, que é reconhecida por desempenhar papel fundamental na adsorção a eritrócitos, células VERO e células epiteliais das trompas de falópio (GLASS et al., 2006; JENSEN et al., 1991; JENSEN, 2004; KRAUSE; TAYLOR-ROBINSON, 1992; PALMER et al., 1991).

Figura 2 – Célula de *M. genitalium* (G-37), não fixada e negativamente corada (x 750 000).

Legenda: A seta indica a porção terminal com a qual a célula adere às células hospedeiras.

Fonte: Tully e Taylor-Robinson, 1981.

Após ter sido isolado de três entre 13 homens com UNG, *M. genitalium* foi também isolado do canal anal de outro homem. Este pode estar presente em ¼ dos homens com UNG, havendo a possibilidade de estar presente no trato digestivo e sendo carregado ao trato geniturinário, uma vez que apresenta similaridades com outras espécies de micoplasmas que infectam o trato digestivo de bovinos e porcos. Homens com infecção por *M. genitalium* são normalmente sintomáticos e alguns pesquisadores associaram a alta prevalência, em algumas populações, à co-infecção por *C. trachomatis* em homens com uretrite. Contudo, embora algumas das características clínicas e a cronologia da infecção ainda não estejam esclarecidas, os homens mais infectados apresentam uretrite, muitos com corrimento, enquanto as mulheres podem apresentar aumento de sintomas geniturinários como corrimento, uretrite e cervicite, ou podendo ser ainda assintomática. Existem dados contraditórios acerca do provável papel de *M. genitalium* nas desordens genitais. Contudo, os dados sugerem que este organismo contribui para alguns casos de DIP

e infertilidade, podendo ser clinicamente não reconhecido devido aos sinais e sintomas brandos. Não há evidências de que esta espécie possa estar presente no trato genital superior de mulheres com salpingite (HAGGERTY; TAYLOR, 2011; JENSEN, 2004; KRAUS; TAYLOR-ROBINSON, 1992; WEINSTEIN; STILES, 2011).

2.2.1.3 *M. penetrans*

Isolado pela primeira vez, em 1991, a partir de amostras de urina de pacientes com HIV/AIDS, as células de *M. penetrans* apresentam-se com ausência de parede celular e com colônias em formato de “ovo frito” crescidas em meio ágar SP4. Apresenta crescimento ótimo em condições de anaerobiose. Requer colesterol para crescer e metaboliza tanto glicose como arginina. Apresenta hemadsorção com eritrócitos humanos e citoadsorção a linfócitos T CD4⁺ e monócitos humanos. Este micoplasma possui formato de haste e apresenta de 0,2 a 0,4 μm de largura e de 0,8 a 2 μm de comprimento. Há dois compartimentos nitidamente divididos, uma estrutura terminal densamente envolvida, e o corpo não envolvido. Possui uma estrutura para adesão às células eucarióticas localizada na extremidade da célula e move-se por deslizamento. A velocidade do deslizamento depende do pH e da temperatura, sendo o pH neutro e a temperatura de 40 °C as condições mais favoráveis (LO et al., 1991; LO, 1992; JURKOVIC; HUGHES; BALISH, 2013).

Além disso, das propriedades de adesão, hemadsorção, e citoadsorção, a espécie é altamente invasiva e capaz de penetrar no citoplasma de células de mamíferos por meio da estrutura diferenciada presente na extremidade da célula (Figura 3). A invasão por *M. penetrans* nas células gera um efeito citopático e leva à morte da célula. Secções ultrafinas, observadas ao microscópio eletrônico, revelam que a estrutura da extremidade é densamente preenchida com grânulos bastante finos (LO et al., 1991; LO, 1992).

Figura 3 – *M. penetrans* (GTU-54) aderido à superfície de uma célula humana endotelial.

Legenda: As estruturas da ponta densamente preenchidas com grânulos (F) e no compartimento do corpo os grânulos mais ásperos (C) permanecendo fora da célula. A membrana profundamente invaginada indicada pela seta é também é evidenciada. Um microrganismo que penetrou completamente na célula também é mostrado (O)

Fonte: Lo et al., 1991

O isolamento de *M. penetrans* a partir de amostras de urina sugere que esta espécie seja sexualmente transmitida. A hipótese de que seja um agente oportunista foi reforçada após ser detectado em pacientes HIV negativos (LO et al., 1993). Estudo realizado por Wang et al. (1993) indica a presença de anticorpos 11,7 vezes maior em indivíduos com sarcoma de Kaposi, uma doença neoplásica hemorrágica que envolve a proliferação de células fusiformes e foi uma das primeiras manifestações observadas da epidemia de AIDS. Por outro lado, estudo realizado no Brasil, por Cunha et al. (1998), reportaram achado da espécie em grupo de homossexuais HIV-negativo. Portanto, a infecção não está vinculada apenas a indivíduos infectados com o vírus HIV. *M. penetrans* pode ser reconhecido no máximo como um co-fator do HIV e do sarcoma de Kaposi. Apesar de existir uma forte associação entre o desenvolvimento e uma soroprevalência ter sido encontrada com relação a este último, estes dados precisam ser confirmados com outros estudos (BLANCHARD; MONTAGNIER, 1994; CORDOVA; CUNHA et al., 2002; GRAU et al., 1998; LO et al., 1993; WANG et al., 1993).

2.2.2 Outros microrganismos de importância ginecológica

2.2.2.1 *Neisseria gonorrhoeae* (gonococos)

N. gonorrhoeae foi assim nomeada em homenagem ao médico alemão Albert Neisser, quem primeiro a descreveu em 1879. As espécies de *Neisseria* são cocos gram-negativos, aeróbias, com 0,6 a 1,0 μm de diâmetro e dispostas em pares (diplococos) com os lados adjacentes e achatados. São móveis, possuem pili, não formam esporos, são positivas para oxidase e produtoras de catalase. A espécie *N. gonorrhoeae* utiliza a glicose como fonte de carboidrato por meio da oxidação, exige meios complexos para o crescimento, sendo prejudicado pela exposição à baixa umidade e ou à ácidos graxos. Todas as cepas de *N. gonorrhoeae* necessitam de cistina e fonte de energia (ex. glicose, piruvato ou lactato) para o crescimento, e muitas cepas necessitam da adição de suplementos como aminoácidos, purinas, pirimidinas e vitaminas. A temperatura ótima de crescimento é de 35°C a 37 °C, sendo sensível a temperaturas mais baixas. Requer ou se beneficia de uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ para seu crescimento podendo apresentar colônias, de diferentes tamanhos, opacas ou transparentes. A natureza fastidiosa da espécie torna difícil o isolamento em espécimes clínicos; no entanto, a bactéria é facilmente transmitida pelo contato sexual.

N. gonorrhoeae apresenta uma série de fatores de virulência como as proteínas de membrana externa Por, Opa e Rmp responsáveis por promover a sobrevivência, mediar adesão às células do hospedeiro e proteger, indiretamente, de antígenos, de superfície respectivamente. Além disso, a variação antigênica da pilina e diferenças antigênicas observadas na proteína PorB fazem com que o indivíduo sofra reinfecções e inviabilizam o desenvolvimento de vacinas (BARLOW; MEARS; GUM, 2006; KONEMAN et al., 1989; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010).

A gonorreia ou blenorragia é uma IST definida como um processo infeccioso causado por *N. gonorrhoeae* que provoca corrimento purulento na região acometida. Os gonococos atacam as mucosas do trato geniturinário, dos olhos, do reto e da garganta, causando supuração aguda que pode levar à invasão tecidual. Em homens, geralmente ocorre uretrite, com pus de aspecto cremoso e amarelado, além de micção dolorosa, entretanto, a infecção uretral pode ser ainda assintomática. Em mulheres, a infecção primária é observada na endocérvice e

estende-se à uretra e à vagina, resultando em corrimento mucopurulento. Pode ainda progredir para as tubas uterinas, causando salpingite, fibrose e obliteração das tubas. A oftalmia neonatal caracterizada por infecção ocular purulenta pode ocorrer em recém-nascido após o parto (BRASIL, 1997; BROOKS, 2012; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; WHO, 2011).

Epidemiologicamente, dos 448 milhões de novos casos de ISTs que ocorrem por ano no mundo, 88 milhões são gonorreia. Das mulheres infectadas, de 60% a 80% não apresentam sintomas, contudo, alguns sinais e sintomas que podem surgir são: disúria, polaciúria e secreção vaginal. Nos homens sinais e sintomas como disúria, secreção purulenta verde-amarelada, polaciúria e urgência miccional também são relatados. Apesar destes indícios, a doença pode evoluir, ainda que assintomaticamente, e muitas das mulheres infectadas evoluem a óbito. Estes dados, portanto, ressaltam a importância do controle da população infectada para interrupção da cadeia de transmissão (BRASIL, 1997; BROOKS, 2012; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2010; WHO, 2011).

2.2.2.2 *Chlamydia trachomatis*

As clamídias são bactérias com parede celular semelhante às bactérias gram-negativas, apresentam um ciclo de vida único multiplicando-se no citoplasma das células do hospedeiro. Estes microrganismos carecem de mecanismos para a produção de energia metabólica e que, portanto, são incapazes de sintetizar ATP. Este fato as restringe a uma existência intracelular em que a célula do hospedeiro fornece intermediários ricos em energia, levando a este microrganismos serem considerados parasitas intracelulares obrigatórios (BROOKS, 2012; DELOST, 1997).

Dentre as três espécies de clamídia que infectam humanos, *Chlamydia trachomatis* é o patógeno mais conhecido do grupo, sendo responsável por mais de uma doença importante. Em seres humanos, podem provocar doenças como o tracoma, a conjuntivite de inclusão, a UNG, salpingite, cervicite, pneumonite de lactentes e linfogranuloma venéreo. Além disso, diversos estudos tem demonstrado associação entre infecções por *C. trachomatis* com prematuridade, baixo peso ao nascer de neonatos, morte neonatal, ruptura prematura de membrana e endometrite pós-parto (BROOKS, 2012; PHILLIPI; ARONE, 2010; THOMAS et al., 1986).

Estudo realizado por Thomas et al. (1986) relata o isolamento de *C. trachomatis* em mulheres que tiveram parto prematuro. No mesmo estudo, o isolamento de duas espécies de micoplasma (*Ureaplasma urealyticum* e *M. hominis*) ocorreu mais em mulheres infectadas com *C. trachomatis*. Desde os primeiros achados de micoplasma genital em pacientes positivos para *C. trachomatis*, que outros pesquisadores procuram entender a relação entre as espécies. Vesic et al. (2010) por exemplo, também encontraram associação entre a presença de *C. trachomatis* e espécies de micoplasma, com destaque para a relação com *U. urealyticum*.

2.2.2.3 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas é um protozoário flagelado, de forma globular ameboide com 10-30 μm de comprimento, núcleo excêntrico piriforme e cinco flagelos móveis, sendo quatro livres e um aderido à parede (membranas ondulantes). O citoplasma, rico em glicogênio, pode ter pequenos vacúolos, sendo capaz de fagocitar bactérias e eritrócitos. Parasito extracelular, cresce em condições de microaerofilia e pH variando de 5,5 a 5,8, semelhante ao existente na vagina, além de ser residente frequente do trato genital feminino. Na presença de *Trichomonas vaginalis* os valores do pH serão sempre superiores a 4,5. Sobrevive sobre várias condições de O_2 e é tolerante a sua presença (AGUIAR; AGUIAR, 2009; JÚNIOR; SIQUEIRA, 2010).

Trichomonas vaginalis é capaz de produzir infecção limitada ao trato genital feminino; entretanto, a ausência de sintomas ocorre com frequência. Produz vaginite específica, infectando o epitélio escamoso do trato genital. Em adultos, possui predileção pela exocérvice, raramente atingindo a endocérvice. A manifestação clínica mais comum é a vaginite com corrimento aquoso ou leitoso de intensidade variável. Entre os sinais clínicos, podem estar presentes prurido, dispareunia, disúria, ardência, irritação dos grandes lábios da vulva, hiperemia da mucosa e ocasionalmente dor pélvica (AGUIAR; AGUIAR, 2009; JÚNIOR; SIQUEIRA, 2010; SOPER, 2008).

Estudo recente realizado por Fraga et al. (2012), evidenciam a possibilidade de células de *T. vaginalis* serem invadidas por endocitose e albergarem *M. hominis* e de, possivelmente, viverem em simbiose. Apesar disso, estudos futuros são importantes para demonstrar as moléculas envolvidas no processo de entrada do *M.*

hominis no parasita, bem como a relação entre a presença destas moléculas com a resistência ou susceptibilidade das cepas de *T. vaginalis* à infecção pela bactéria, e determinar o papel de micoplasmas na patogênese do *T. vaginalis*.

O tratamento para infecções por *T. vaginalis* é essencialmente realizado com metronidazol (5-nitroimidazol) e seus derivados, consistindo na administração de 2 g de metronidazol por via oral em dose única ou 500 mg de 12 em 12 horas durante sete dias. É preciso tratar em concomitância o parceiro sexual para que se interrompa a cadeia de transmissão (AGUIAR; AGUIAR, 2009; JÚNIOR; SIQUEIRA, 2010; SOPER, 2008).

2.2.2.4 *Gardnerella vaginalis*

Gardnerella vaginalis é um bacilo facultativo e gram-variável. Um dos agentes etiológicos da VB, *Gardnerella vaginalis* continua sendo a principal espécie relacionada com a doença. Por um desequilíbrio da microbiota ocorre um aumento desta bactéria e de outros agentes como, por exemplo, *Bacteroides sp.* e micoplasmas provocando leucorreia vaginal acinzentada ou amarelada, de aspecto cremoso e algumas vezes, bolhoso, sendo mais acentuada no período menstrual e após o coito. Além disso, prurido vaginal, dispareunia e odor acentuado após a relação sexual também podem ocorrer. Mulheres com VB apresentam maior incidência de partos prematuros e, conseqüentemente, há maior incidência de morbidade e mortalidade nos recém-nascidos. O tratamento normalmente é feito com uso de metronidazol ou clindamicina (AGUIAR; AGUIAR, 2009; LEVINSON, 2010; MUZNY; SCHWEBKE, 2013).

2.3 Polimorfismos de citocinas

O termo interleucina foi originalmente criado, em 1981, para descrever moléculas produzidas por leucócitos que também atuam sobre as mesmas. Atualmente, é sabido que as interleucinas podem ser produzidas por uma interação com uma variedade de tipos celulares. O amplo envolvimento das citocinas e seus receptores têm mostrado valorosas contribuições na área clínica. Estas são úteis como biomarcadores moleculares de doenças e fornecem pistas para o mecanismo de patologias, além de servir para o monitoramento do *status* imunológico, indicar

nova classe de agentes terapêuticos e ainda auxiliar no desenvolvimento de vacinas. Contudo, deve ser notado que a presença de citocinas na circulação representa uma resposta do hospedeiro a um processo patológico, que pode ser ou não específico para determinada doença. Apesar disso, a dosagem de citocinas em doenças inflamatórias, agudas e crônicas, tem sido utilizada como indicador da atividade da doença. Durante a inflamação aguda ou rejeição de enxerto, as citocinas inflamatórias IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ são frequentemente detectadas (DETRICK; NAGINENI; HOOKS, 2008).

Além do reconhecido papel das citocinas na inflamação e infecção, e do fato de serem boas candidatas para investigação de infecções, é também sabido que a complexa interação entre patógenos bacterianos e parasitários e o hospedeiro infectado pode ser determinada pela característica genética do hospedeiro envolvido. Neste contexto, o polimorfismo de citocinas constitui um aspecto importante a ser estudado para melhor determinar a influência deste fator no estabelecimento de uma infecção bem como na melhor compreensão da relação parasito-hospedeiro (RYCKMAN et al., 2008; SCHEE et al., 2001).

2.3.1 Interleucina-1 β (IL-1 β)

A interleucina-1 é uma proteína produzida principalmente por macrófagos. IL-1 aciona uma ampla variedade de células-alvo, por exemplo, linfócitos T e B, neutrófilos e células endoteliais. Atua como citocina pró-inflamatória, isto é, desempenha importante papel, juntamente com o fator de necrose tumoral (TNF), na indução da inflamação. Além disso, IL-1 é um pirogênio endógeno que age no hipotálamo, provocando febre associada a infecções e outras reações inflamatórias (LEVINSON, 2010).

Os genes IL1A (OMIM147760) e IL1B (OMIM147720) compõem o bloco de genes codificadores da Interleucina 1 (IL-1), uma família de proteínas envolvidas na proliferação, diferenciação e apoptose celular. As proteínas IL-1 α e IL-1 β , por sua vez, são citocinas expressas por vários tipos de células além dos macrófagos ativados como: queratinócitos, linfócitos B estimulados e fibroblastos, sendo mediadores potentes da inflamação e imunidade. IL-1 α atua preferencialmente como reguladora de eventos intracelulares e como mediador da inflamação local. Enquanto que IL-1 β é primariamente uma proteína extracelular secretada pelas

células (DINARELLO, 1996; MEAGER, 1998). Estas proteínas são sintetizadas como precursores maiores (~30 kDa) contendo cerca de 270 aminoácidos, que são produzidos intracelularmente por meio da clivagem dos aminoácidos 159 C-terminal e 153 C-terminal gerando peptídeos menores (~17,5 kDa) transformados em IL-1 α e IL-1 β respectivamente. A expressão proteica também está diretamente relacionada à lesão celular. Além disso, IL-1 α e IL-1 β estimulam, “in vitro”, a atividade dos osteoclastos e são considerados fatores importantes da reabsorção óssea (LORD et al., 1991).

O gene de IL-1A e IL-1B está mapeado no braço longo do cromossomo 2, q14 (LATKOVSKIS; LICIS; KALNINS, 2004). Variações genéticas dos genes de IL-1 β têm sido, inconsistentemente, associados com o risco de parto prematuro e vaginose bacteriana. Dentre os polimorfismos citados, o localizado em um éxon na posição +3954 (C>T) do gene IL-1B (Figura 4) tem sido associado à maior produção da citocina IL-1 β (ENGEL et al., 2005; EDWARDS; FERGUSON; DUFF, 2006; GENC et al., 2002; MENON et al., 2006.).

Figura 4 – Mapa do grupo de genes de IL-1 no cromossomo 2 (sem escala).

Legenda: Possíveis SNPs funcionais estão anotados para IL-1A, IL-1B e IL-1RN.
Fonte: Smith e Humphries, 2009.

2.3.2 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina multifuncional, expressa em diferentes tipos de células, contribuindo na diferenciação das células B e na proliferação de células T. Esta proteína também estimula a hematopoiese e acelera a reabsorção óssea, sendo considerada a principal mediadora da resposta do hospedeiro à lesão e infecção (LEVINSON, 2010; TREVILATTO et al., 2003). A IL-6 está envolvida na patogênese de diversas doenças, tais como artrite reumatóide, psoríase, doença de Alzheimer e também a doença periodontal (MOREIRA et al., 2007; TERVONEN et al., 2007; TREVILATTO et al., 2003).

O gene da IL-6 humana contém cinco éxons e quatro íntrons e está localizada no braço curto do cromossomo 7 (7p21-7p14). O polimorfismo comum -174 G>C (rs1800795), desde que foi identificado é o mais amplamente estudado em relação ao gene da citocina IL-6 (MEAGER; 1998). O gene da IL-6 não contém polimorfismos dentro de regiões codificantes e, conseqüentemente, atenção maior tem sido dada aos polimorfismos presentes na região promotora (Figura 5). O estudo destes polimorfismos, sua relação na indução de outras citocinas, como IL-1 β , e a participação como fator determinante na evolução de diversas doenças tem sido bastante estudado (SMITH; HUMPHRIES, 2009).

Figura 5 – Mapa da região regulatória do gene IL-6 e possível mecanismo regulador da expressão deste.

Legenda: (a) Mapa da região regulatória do gene IL-6. Os polimorfismos comumente estudados estão assinalados, incluindo o recentemente anotado -6331 T>C, por meio do qual o alelo T cria uma região de ligação Oct. (b) Possível mecanismo pelo qual o SNP distal -6331T pode regular a expressão do gene pela ligação com o fator proximal Oct-1, trazendo a região regulatória próxima da maquinaria de transcrição.

Fonte: Smith e Humphries, 2009.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

- Detectar *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* e *M. penetrans* em trato genital feminino e relacionar com polimorfismo genético e expressão de citocinas em mulheres com ou sem distúrbios genitais atendidas no município de Vitória da Conquista – BA.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* e *M. penetrans* por meio da PCR convencional em mulheres, com ou sem distúrbios genitais, atendidas no município de Vitória da Conquista – BA;
- quantificar *Mycoplasma hominis* e *M. genitalium* por meio da PCR em tempo real em mulheres, com ou sem distúrbios genitais, atendidas no município de Vitória da Conquista – BA;
- realizar diagnóstico diferencial de outros microrganismos (*Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*) de importância ginecológica em mulheres, com ou sem distúrbios genitais, atendidas no município de Vitória da Conquista – BA;
- realizar a análise molecular por PCR-RFLP dos polimorfismos das citocinas IL-1 β e IL-6 em mulheres, com ou sem distúrbios genitais, atendidas no município de Vitória da Conquista – BA;
- dosar as citocinas por ELISA no soro de mulheres, com ou sem distúrbios genitais, atendidas no município de Vitória da Conquista – BA;
- relacionar os dados de detecção e quantificação dos microrganismos e os polimorfismos genéticos das citocinas obtidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Procedimento de coleta das amostras

As coletas foram realizadas entre os meses de Maio, Junho e Julho de 2011 e Janeiro de 2012. Estas ocorreram nos consultórios, de enfermagem ou médico, de cada uma das cinco Unidades de Saúde da Família (USFs) participantes do estudo (USF do Pradoso, USF da Urbis V, USF CSU, USF Nelson Barros e USF do Miro Cairo) e foram realizadas pelos responsáveis da pesquisa e por vezes, quando solicitado, pelos profissionais de saúde dos postos que eram habilitados para realização de tal procedimento. Nas oportunidades em que profissionais dos postos realizaram a coleta, sempre havia um dos responsáveis pela pesquisa para contribuir na validação do estudo proposto. Neste contexto, foram observadas as condições de assepsia adequadas, e também foi notada a infraestrutura disponível em cada USF.

Antes das coletas, o objetivo do estudo foi apresentado a cada indivíduo de forma sucinta e com linguagem simples. Em seguida, as pacientes foram convidadas a participar voluntariamente da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Em caso de resposta negativa, procedia-se unicamente o atendimento previsto para coleta de material citopatológico – o Papanicolaou. Em caso de resposta positiva, procedeu-se a coleta do material clínico do estudo e a aplicação do questionário (Anexo A). Em caso de resposta dentro dos critérios de exclusão da pesquisa, o motivo da descontinuidade da participação era então comunicado e esclarecido.

Na ocasião da coleta, o operador utilizava Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) – máscara, luvas e gorro, para garantir a sua segurança bem como para assegurar a assepsia do procedimento. Para realização da coleta de amostra genital foram utilizados swabs de madeira estéreis com algodão hidrofílico. Após a exposição da genitália interna, com auxílio do espéculo, os swabs foram friccionados de forma suave na superfície mucosa da vagina e do colo do útero da mulher de modo que absorvesse a maior quantidade de corrimento ou muco cervical possível. O swab foi acondicionado em tubo com 5 mL de meio de transporte como descrito por Bussolo et al. (1981) com algumas modificações. Os tubos foram mantidos refrigerados em caixa isotérmica até o processamento em laboratório.

A coleta do material sanguíneo, sempre que possível, ocorria em local distinto da coleta do material genital a depender das limitações físicas da unidade de saúde. Para realização deste procedimento, o operador munido de EPIs realizava punção venosa periférica, preferencialmente, em membro superior não dominante. Foram coletados cerca de 5 mL de sangue em cada um dos tubos, com e sem EDTA, que foram conservados de forma similar aos swabs, em caixa isotérmica refrigerada.

O material obtido foi levado até o Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal da Bahia - Campus Anísio Teixeira, localizado na cidade de Vitória da Conquista, para análise e estoque em freezer. Os tubos de ensaio com os swabs foram homogeneizados em aparelho tipo vórtex para eluição do material clínico no meio de transporte. Após isto, foram então distribuídas alíquotas de 1 mL em microtubos e estes últimos foram identificados com as iniciais das mulheres e número de série. O sangue periférico contido em tubos tipo Vacutainer com EDTA foram acondicionados prontamente a -20 °C. Os tubos sem EDTA foram centrifugados a 3.500 rpm para obtenção do soro, seguido de sua distribuição em alíquotas de cerca de 1 mL e estocados a -80 °C até o uso.

4.2 Padronização das cepas utilizadas

Como controle positivo dos testes moleculares, foram utilizadas três cepas de referência de micoplasma: *M. hominis* ATCC 23114 (PG-21), *M. penetrans* ATCC 55252 (GTU 54) e *M. genitalium* ATCC 33530 (G37). As cepas foram obtidas da coleção do Laboratório de Micoplasmas ICB/USP. Destas cepas foram extraídos os respectivos DNAs para o controle dos testes realizados com as amostras clínicas. O meio de cultura SP4, descrito por Tully et al. (1995) foi utilizado nos subcultivos das cepas de referência. Na avaliação das características de colônias utilizou-se o meio sólido contendo 1% de ágar. Os microrganismos, previamente estocados a -70 °C, foram subcultivados em Meio SP4 sólido e líquido, inoculando-se 200 µL de cada cultura em 1,8 mL de meio líquido, incubados a 37 °C. O controle do crescimento foi realizado pela observação de mudança de cor no meio líquido, acrescido de indicador de pH (vermelho de fenol), resultante da hidrólise da arginina ou fermentação da glicose. No meio sólido observou-se a produção de pequenas colônias em forma de “ovo frito”.

Para o controle dos experimentos de detecção dos demais microrganismos de interesse ginecológico (*Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*), por meio da PCR convencional, foram utilizadas cepas cedidas gentilmente pelo Professor Dr. Jorge Luiz Melo Sampaio, pesquisador associado do Instituto Fleury. As amostras dos microrganismos eram provenientes de amostras clínicas testadas previamente nos laboratórios do Grupo Fleury.

4.3 Extração de DNA das amostras de swab vaginal

A extração de DNA das amostras de material genital ocorreu por meio da técnica descrita por Fan, Kleven e Jackwood (1995), também conhecida por método de fervura. O procedimento ocorreu a partir de 1 mL do material. Em microtubos, estes volumes foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e o sedimento lavado com 100 μ L de PBS (pH 7,2). A suspensão foi homogeneizada e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos por duas vezes. O sobrenadante de cada amostra clínica lavada foi removido e o sedimento homogeneizado em 40 μ L de PBS (pH 7,2). Em seguida, cada amostra foi fervida por 10 minutos e resfriada em gelo por 5 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas mais uma vez a 10.000 rpm durante 10 minutos. Por fim, foi coletado o sobrenadante contendo o DNA liberado do citoplasma, devido à lise celular. Realizada a extração, as amostras foram estocadas a -20 °C até o momento do uso.

4.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional

As amostras clínicas coletadas foram submetidas a PCR convencional para a Classe Mollicutes. Amostras positivas nesta PCR, foram submetidas a PCR espécie-específica para a *M. hominis*, *M. genitalium* e *M. penetrans*. Além disto, as amostras também foram submetidas a PCR para diagnóstico diferencial para *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

4.4.1 PCR para a detecção de *Mollicutes*

Para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi adicionado a um microtubo (0,2 mL) 1X de Tampão (Buffer), 50 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 2,0 mM de $MgCl_2$, 200 μM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 1 μL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 μL . A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 5 min, 34 ciclos de 94 °C por 30 s, 57,7°C por 30 s e 72°C por 1 min, um ciclo final de 72 °C por 10 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 1 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes para amplificar parte do gene da unidade 16S do rRNA da Classe *Mollicutes*. O produto amplificado esperado foi de 270 pb (VAN KUPPEVELD et al., 1992).

Quadro 1 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *Mollicutes* e peso molecular do produto amplificado.

Iniciadores	Sequência	Produto
GPO3	5' GGG AGC AAA CAC GAT AGA TAC CCT 3'	~ 270 pb
MGSO	5' TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC 3'	

4.4.2 PCR para detecção da espécie *M. hominis*

Para esta PCR, foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão, 25 pmols de cada iniciador, 2,5 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 1,5 μM de $MgCl_2$, 200 mM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 5 μL de DNA extraído da amostra clínica e água ultrapura até o volume final de 50 μL . A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 95 °C por 10 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 61 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, um ciclo final de 72 °C por 10 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 2 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes para amplificação de 334 pb do amplicon da região do gene 16S rRNA do *M. hominis* (DAXBOECK et al., 2003).

Quadro 2 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *M. hominis* e peso molecular do produto amplificado.

Iniciadores	Sequência	Produto
M1	5'-CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C-3'	~334 pb
M2	5'-GGT ACC GTC AGT CTG CAA T-3'	

4.4.3 PCR para detecção da espécie *M. genitalium*

Para esta PCR, foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão, 40 pmol de cada iniciador, 2 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 2 mM de MgCl₂, 50 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 3 µL da amostra de DNA extraído da amostra clínica e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 10 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, um ciclo final de 72 °C por 10 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 3 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes para amplificação de 427 pb do amplicon da região do gene 16S rRNA do *M. genitalium* (JENSEN; BORRE; DOHN, 2003).

Quadro 3 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *M. genitalium* e peso molecular do produto amplificado.

Iniciadores	Sequência	Produto
MG16-45F	5'-TAC ATG CAA GTC GAT CGG AAG TAG C-3'	~ 427 pb
MG16-447R	5'-AAA CTC CAG CCA TTG CCT GCT AG-3'	

4.4.4 PCR para detecção da espécie *M. penetrans*

Para esta PCR, foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão, 10 pmol de cada iniciador, 2 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 1 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 2 µL da amostra de DNA extraído da amostra clínica e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado

para: um ciclo de 94 °C por 10 min, 40 ciclos de 94 °C por 30 s, 65 °C por 1 min e 72 °C por 2 min, um ciclo final de 72 °C por 10 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 4 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes, para amplificação de 704 pb do amplicon da região do gene 16S rRNA do *M. penetrans* (HAIER et al., 1999).

Quadro 4 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do gene 16S rRNA para *M. penetrans* e peso molecular do produto amplificado.

Iniciadores	Sequência	Produto
IMM-7 MP	5'-GGA AAC GGG AAT GGT GGA ACA GAT-3'	~ 704 pb
IMM-5 MP	5'-TTC TGC TAA TGT TAC AGC AGC AGG-3'	

4.4.5 PCR para detecção de *Neisseria gonorrhoeae*

Para realização desta PCR foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão, 100 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 1 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por 30 s, um ciclo final de 72 °C por 7 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 5 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes, para amplificação de 195 pb do amplicon da região do gene 16S rRNA da *Neisseria gonorrhoeae* (MAHONY et al., 1995; MGONE; LUPIWA; YEKA, 2002).

Quadro 5 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de *Neisseria gonorrhoeae*.

Iniciadores	Sequência	Produto
NG1	5' - TCT CGA CTG GGC AAT TTT CC - 3'	~ 195 pb
NG2	5' - ACG AGG CAT TGA AGC AAA GC - 3'	

4.4.6 PCR para detecção de *Chlamydia trachomatis*

Para realização desta PCR foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão, 100 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 2 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por 30 s, um ciclo final de 72 °C por 7 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 6 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes, para amplificação de 241 pb do amplicon da região do gene 16S rRNA da *Chlamydia trachomatis* (MAHONY et al., 1995; MGONE; LUPIWA; YEKA, 2002).

Quadro 6 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de *Chlamydia trachomatis*.

Iniciadores	Sequência	Produto
CT 1	5'- CCT GTG GGG AAT CCT GCT GAA -3'	~ 241 pb
CT 4	5'- GTC GAA AAC AAA GTC ATC CAG TAG TA -3'	

4.4.7 PCR para detecção de *Gardnerella vaginalis*

Para realização desta PCR foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão), 100 pmol de cada iniciador, 2 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 2,5 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 1 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por 30 s, um ciclo final de 72 °C por 7 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 7 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes para amplificação de 332 pb do amplicon da região do gene 16S rRNA da *Gardnerella vaginalis* (ZARFFARD et al., 2002).

Quadro 7 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de *Gardnerella vaginalis*.

Iniciadores	Sequência	Produto
GV1	5'-TTACTGGTGTATCACTGTAAGG-3'	~ 332 pb
GV3	5'-CCGTCACAGGCTGAACAGT-3'	

4.4.8 PCR para detecção de *Trichomonas vaginalis*

Para realização desta PCR foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão, 100 pmol de cada iniciador, 2 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 1 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 1 min, 35 ciclos de 94 °C por 15 s, 55 °C por 15 s e 72 °C por 30 s, um ciclo final de 72 °C por 7 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 8 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes para amplificação de 102 pb do amplicon da região do gene 16S rRNA da *Trichomonas vaginalis* (RILEY et al., 1992).

Quadro 8 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica para detecção de *Trichomonas vaginalis*.

Iniciadores	Sequência	Produto
TVA5	5'-GAT CAT GTT CTA TCT TTT CA-3'	~ 102 pb
TVA6	5'-GAT CAC CAC CTT AGT TTA CA-3'	

4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa

O DNA genômico das amostras de swab vaginal foi obtido segundo protocolo do kit Invitrogen Purelink™ Genomic DNA Kits (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil). A PCR em tempo real foi realizada em duplicata, utilizando a plataforma Applied Biosystems. A técnica foi realizada por meio da utilização de Sondas *TaqMan*, usando um protocolo base de amplificação para cada espécie.

4.5.1 PCR quantitativo para a detecção de *M. hominis*

Na realização da PCR em tempo real para detecção da espécie *M. hominis* foram utilizadas placas próprias para realização da técnica, adicionado a cada poço (0,2 mL): 12,5 μ L de Master Mix (Applied Biosystems, São Paulo, S.P., Brasil), 0,6 μ L de primer MHyidCfwd (5'-TCACTAAACCGGGTATTTTCTAACAA-3') (10 pmols), 0,6 μ L de primer MHyidCrev (5'-TTGGCATATATTGCGATAGTGCTT-3') (10 pmols), 0,8 μ L de sonda (5'-FAM-CTACCAATAATTTTAATATCTGTCGGTATG-MGB-3') (5 mM), 8,5 μ L de água e 2 μ L de DNA, com volume final da reação de 25 μ L. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50 °C por 10 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (FÉRADON et al., 2011).

4.5.2 PCR quantitativo para a detecção de *M. genitalium*

Para realização da PCR em tempo real da espécie *M. hominis* foram utilizadas placas próprias para realização da técnica, adicionado a cada poço (0,2 mL): 12,5 μ L de Master Mix (Applied Biosystems São Paulo, S.P., Brasil), 2,5 μ L de primer MgPa-355F (5'-GAGAAATACCTTGATGGTCAGCAA-3') (10 pmols), 2,5 μ L de primer MgPa-432R (5'-GTTAATATCATATAAAGCTCTACCGTTGTTATC-3') (10 pmols), 0,5 μ L de sonda (FAM-ACTTTGCAATCAGAAGGT-MGB) (5 mM), 2 μ L de água e 5 μ L de DNA, com volume final de 25 μ L. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50 °C por 10 minutos, 95 °C por 10 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto (OLSEN et al., 2009).

4.5.3 Análise dos dados da PCR quantitativa

A quantificação dos microrganismos foi realizada por meio de técnica de quantificação absoluta, tomando por base uma curva padrão, previamente estabelecida, variando de 10^7 a 10^0 microrganismos/ μ L (Figura 6). Para cada reação feita, uma nova curva padrão foi adicionada e parâmetros de qualidade foram

adotados na análise, sendo estes: $r^2 \geq 0.950$, eficiência da reação variando de 95% a 105% e slope próximo de 3.32.

Figura 6 – Gráficos gerados a partir da reação de PCR em tempo real para determinação da curva padrão utilizada nos testes para a espécie *M. genitalium*.

Legenda: **a.** Gráfico de amplificação de cada amostra de DNA de *M. genitalium*, previamente diluída em razão 1:10, que ilustra o intervalo de detecção de 10^7 a 10^0 cópias de DNA do microrganismo por amostra. **b.** Curva padrão gerada a partir dos pontos de Ct obtidos com o gráfico de amplificação.

4.6 Análise do polimorfismo de citocinas

4.6.1 Extração de DNA das amostras de sangue

Amostras de sangue, homogeneizadas, dos tubos vacutainer com EDTA (1000 μ L) foram utilizadas para extração de DNA baseado no protocolo de extração descrito pelo fabricante do Kit Invitex Invisorb – Spin Blood Midi/ Maxi Kit 1209 (Strattec molecular, São Paulo, S.P., Brasil). As amostras de DNA extraídas foram aliquotadas (200 μ L) em microtubos e estocadas em -20 °C.

4.6.2 MS-PCR para detecção do polimorfismo monogenético na citocina IL-6

A MS-PCR é uma técnica de PCR direcionada à identificação de mutações alélicas baseada nas sequências de ácidos nucleicos. O princípio básico do método é a introdução de mutações nas regiões de ligação dos iniciadores da PCR nos

amplicons, a partir de diferentes distâncias da extremidade 3'. Nos ciclos subsequentes as mutações previnem a formação de produtos errados da elongação por conta da ligação específicas de cada primer (RUST; FUNKE; ASSMANN, 1993). Para detecção do polimorfismo G>C no gene IL-6 foram utilizados iniciadores específicos (IL-6G, IL-6C e IL6GSP) para a região -174 do cromossomo. O quadro 9 resume os dados dos iniciadores utilizados na reação.

Quadro 9 – Sequências dos iniciadores utilizados para detecção de polimorfismo monogenético na região -174 do cromossomo que codifica a IL-6 e peso molecular do produto amplificado.

Iniciadores	Sequência	Produto
IL-6G	5'-GCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTACG-3'	~ 121 pb
IL-6C	5'-ATGACGACCTAAGCTTTACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGAC-3'	~ 136 pb
IL-6GSP	5'-ATAAATCTTTGTTGGAGGGTGAGG-3'	-

Para realização da MS-PCR foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão), 100 pmol de cada iniciador, 1 U de Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 1 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 6 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 7 min, 45 ciclos de 94 °C por 45 s, 57,3 °C por 1 min e 15 s e 72 °C por 1 min e 15 s, um ciclo final de 72 °C por 7 min e “hold step” a 4 °C (SCHOTTE et al., 2001). O produto da MS-PCR foi submetido à eletroforese em Gel de agarose a 4% com brometo de etídio em 110V.

4.6.3 PCR RFLP para detecção do polimorfismo no gene IL-1B

A região +3954 do gene IL-1B onde ocorre o polimorfismo foi avaliada por PCR convencional e digestão. Para realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi adicionado a um microtubo (0,2 mL): 1X de Tampão, 10 pmol de cada iniciador, 1 U Taq DNA polimerase Invitrogen (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil), 1 mM de MgCl₂, 200 µM de deoxiribonucleotídeos trifosfato (dNTP), 7 µL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 µL. A amplificação foi realizada em

termociclador programado para: um ciclo de 94 °C por 5 min, 40 ciclos de 94 °C por 1 min, 61,5 °C por 1 min e 72 °C por 1 min, um ciclo final de 72 °C por 7 min e “hold step” a 4 °C. O quadro 10 mostra as sequências do par de iniciadores utilizados nos testes para amplificação do produto de 182 pb detectada em eletroforese com gel de agarose a 1% (AGRAWAL et al., 2006).

Quadro 10 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação de região gênica específica em que ocorre mutação monogênica para IL-1 β e peso molecular do produto amplificado.

Iniciadores	Sequência	Produto
P1	5'- CTC AGG TGT CCT CGA AGA AAT CAA A -3'	~ 182pb
P2	5'- GCT TTT TTG CTG TGA GTC CCG – 3'	

Em seguida, as amostras com produtos amplificados foram submetidas à digestão com enzima de restrição TaqI (New England Biolabs, Beverly, M. A., Estados Unidos) (RFLP) para se obter a distribuição dos alelos. Em cada microtubo (0,2 μ L) continha a mistura da reação com: 2,5 mM de Tampão, 0,13 μ L da enzima TaqI, 15,0 μ L de DNA e água ultrapura até o volume final de 50 μ L. A digestão foi realizada em termociclador programado para: um ciclo de 64 °C “overnight”. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em Gel de agarose a 4% com brometo de etídio em 110V.

4.6.4 Confirmação do polimorfismo genético dos genes IL-1B e IL-6 por sequenciamento

Após as PCRs, os produtos amplificados, evidenciados no gel por meio da luz ultravioleta, foram recordados diretamente do gel e submetidos ao processo de purificação. A purificação do produto foi feita com kit comercial Qiagen - QIAquick Gel extraction Kit (Qiagen, Chatsworth, C.A., Estados Unidos) e foram seguidas as instruções do fabricante. O produto amplificado de cada PCR foi sequenciado utilizando a plataforma Sanger ABI 3700 do *Genomics Core Facility* localizado na Purdue University, Estados Unidos. As sequências obtidas foram comparadas com os genes de referência descritos para IL-6 e IL-1B na base de dados do NCBI.

4.7 Dosagem das citocinas IL-1 β e IL-6 no soros das mulheres

A dosagem das citocinas IL-1 β e IL-6 foram realizadas utilizando-se kit de ELISA eBioscience (eBioscience, San Diego, C. A., Estados Unidos) e placas de 96 poços de poliestireno de alta absorção de acordo com protocolo indicado pelo fabricante. Após padronização da curva padrão e do volume mais adequado para as amostra, uma alíquota de 100 μ L do soro das mulheres foram utilizados para dosar as citocinas IL-1 β e IL-6. A leitura foi realizada com instrumento leitor de ELISA Vivid Vision com comprimento de onda de 450 nm. Os dados obtidos em absorbância foram transformados em picomols por meio de fórmula matemática.

4.8 Análise estatística

As informações clínico-epidemiológicas foram analisadas estatisticamente usando o software SPSS 16.0® (SPSS Inc., Chicago, Estados Unidos). Para verificação de associação entre variáveis foi aplicado Teste de qui-quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher. Foi considerado $p < 0,05$ e IC 95%. Para a avaliação dos fatores de risco associados às infecções empregaram-se o Odds Ratio (OR) e análise univariada. Para maximizar a função de verossimilhança do risco e descartar variáveis de confusão, empregou-se análise multivariada por regressão logística.

Para análise dos dados de quantificação das citocinas e sua relação com polimorfismos genéticos e a presença dos microrganismos foi utilizado o programa GraphPad Prism. Foram realizados o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (quando avaliados mais de dois grupos) e Mann-Whitney (quando avaliados dois grupos).

5 RESULTADOS

5.1 PCR convencional para a detecção de micoplasmas

As amostras de DNA extraídas pelo método de fervura foram testadas por meio da PCR convencional, para a presença de DNA de *Mollicutes* pelo uso de iniciadores genéricos. Na Figura 7 está apresentada a detecção do produto amplificado esperado de 270 pb nas amostras clínicas. Das 302 amostras clínicas testadas, 230 (76,2%) foram positivas. Estas amostras positivas foram submetidas à PCR para a detecção do DNA de *M. hominis*, *M. genitalium* e *M. penetrans*. Destas, 48 (15,9%) das amostras foram positivas para *M. hominis*, sendo que na Figura 8 é possível observar o produto amplificado de 334 pb das amostras positivas. Para *M. genitalium*, 5 (1,7%) das amostras foram positivas. Na figura 9 é possível observar o produto amplificado de 427 pb das amostras positivas. Entre as amostras testadas para *M. penetrans*, todas foram negativas. Na figura 10 é possível observar o produto amplificado de 704 pb correspondente a amostra de referência GTU 54 utilizada como controle positivo da reação. Os dados das PCR convencionais estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 – Perfil de detecção de *Mollicutes*, *M. hominis*, *M. genitalium* e *M. penetrans*, por meio da PCR convencional, em amostras de swab vaginal de mulheres atendidas em Unidades de Saúde de Vitória da Conquista - BA, 2011.

PCR	Genérica	<i>M.</i> <i>hominis</i>	<i>M.</i> <i>genitalium</i>	<i>M.</i> <i>penetrans</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Positiva^a	230 (76,2)	48 (15,9)	5 (1,7)	0 (0)
Negativa^b	72 (23,8)	254 (84,1)	297 (98,3)	302 (100)

Nota: n = 302 amostras

^aPositiva - Detecção de produto de DNA esperado

^bNegativa - Ausência de produto de DNA esperado

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR utilizando “primers” GPO3 e MGSO com DNA das amostras coletadas e das cepas de referência de *M. penetrans*, *M. hominis* e *M. genitalium*.

Legenda: Colunas 1, 2, 5, 7, 8, 11, 12, 14 e 15: amostras amplificadas; Colunas: 3, 4, 6, 9, 10, 13 e C¹+: amostras não amplificadas. Legenda: SA: Sem Amostra; PM: Peso Molecular (100 pb); C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo (C¹+: P5 *M. penetrans*; C²+: PG21 *M. hominis*; C^{3, 4 e 5}+: *M. genitalium*).

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR utilizando “primers” M1 e M2 com DNA das amostras coletadas e da cepa de referência de *M. hominis* ATCC 23114 (PG-21).

Legenda: Colunas 100, 111, 114, 116, 118: amostras amplificadas; Colunas: 92, 94, 97, 98, 99, 101, 105, 107, 110, 112, 113 e 123: amostras não amplificadas. Legenda: PM: Peso Molecular (100 pb); C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo (PG21 - *M. hominis*).

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR utilizando “primers” MG16-45F e MG16-447RR com DNA das amostras coletadas e da cepa de referência de *M. genitalium* ATCC 33530 (G37).

Legenda: Colunas 56: amostra amplificada; Colunas: 31, 36, 38, 40, 43, 44, 46, 48, 53 e 57: amostras não amplificadas. Legenda: PM: Peso Molecular (100 pb); C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo (G37 - *M. genitalium*).

Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR utilizando “primers” IMM-7 MP e IMM-5 MP com DNA das amostras coletadas e da cepa de referência de *M. penetrans* ATCC 55252 (GTU 54).

Legenda: Colunas: 65, 68, 69, 72, 73, 74, 75, 79, 85, 86, 87, 88, 89, 90 e 91: amostras não amplificadas. Legenda: PM: Peso Molecular (100 pb); C-: Controle Negativo; C+: Controle Positivo (G54 - *M. penetrans*).

5.2 PCR quantitativo (qPCR) para a detecção de micoplasmas

A Tabela 2 apresenta a frequência de detecção de *M. hominis* e *M. genitalium*, detectados por meio da PCR em tempo real, nas mulheres participantes do estudo; sendo, respectivamente, em 31,8% (96/302) e 28,1% (85/302) das amostras clínicas.

Tabela 2 – Perfil de detecção de *M. hominis* e *M. genitalium*, por meio da qPCR, em amostras de swab vaginal de mulheres atendidas em Unidades de Saúde de Vitória da Conquista - BA, 2011.

qPCR	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>
	n (%)	n (%)
Positiva^a	96 (31,8)	85 (28,1)
Negativa^b	206 (68,2)	217 (71,9)

Nota: n = 302 amostras

^aPositiva - Detecção de produto de DNA esperado

^bNegativa - Ausência de produto de DNA esperado

Por meio da PCR em tempo real foi possível quantificar DNA e consequentemente a carga de *M. hominis* e *M. genitalium* representadas por unidades formadoras de colônias - ufc/ μ l nas amostras de swab vaginal. Na Figura 11 estão apresentadas as detecções de aproximadamente 10^4 a 1 ufc/ μ l de *M. hominis*. Para *M. genitalium*, apenas uma mulher apresentou carga microbiana alta ($>10^3$ UFC/ μ l) enquanto as demais apresentaram variações de carga microbiana de 1 a $<10^2$ UFC/ μ l. Contudo, as médias das dosagens, para ambas as espécies de micoplasma, foram maiores que nas mulheres do grupo controle. Por outro lado, após análise estatística por Mann-Whitney não foi possível observar diferença estatisticamente significativa tanto para a espécie *M. hominis* ($p = 0,216$) quanto para *M. genitalium* ($p = 0,217$).

Figura 11 – Quantificação por qPCR, de *M. hominis* e *M. genitalium* (UFC/ μ l) a partir das amostras de swab vaginal, nos grupos caso e controle.

Legenda: **(a)** Concentração de *M. hominis* (UFC/ μ l) nas amostras de swab vaginal das mulheres casos e controles **(b)** Concentração de *M. genitalium* (UFC/ μ l) nas amostras de swab vaginal das mulheres casos e controles. Desvio padrão e média indicados por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística realizada por Mann Whitney. $P < 0,05$.

5.3 PCR convencional para a detecção de outros microrganismos de importância ginecológica

A frequência da detecção do DNA alvo de *T. vaginalis* (3,0%), *N. gonorrhoeae* (21,5%), *G. vaginalis* (42,4%) e *C. trachomatis* (1,7%) nas 302 mulheres participantes do estudo estão sumarizadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Perfil de detecção de diferentes microorganismos de importância ginecológica em amostras de swab vaginal testadas por meio da PCR convencional, em mulheres atendidas em Unidades de Saúde de Vitória da Conquista - Ba, 2011.

PCR	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Positiva^a	9 (3,0)	65 (21,5)	128 (42,4)	5 (1,7)
Negativa^b	293 (97,0)	237 (78,5)	174 (57,6)	297 (98,3)

Nota: n = 302 amostras

^aPositiva - Detecção de produto de DNA esperado

^bNegativa - Ausência de produto de DNA esperado

5.4 Análise do perfil demográfico das mulheres atendidas em relação aos resultados obtidos nas PCRs convencionais e quantitativas

5.4.1 Detecção de *Mollicutes*, *M. hominis* e *M. genitalium* por meio da PCR e qPCR e a distribuição dos micoplasmas na população estudada

Nos dados analisados, das mulheres em que foi detectado com maior frequência *Mollicutes* e as espécies *M. hominis* e *M. genitalium* estão aquelas que viviam na região urbana, com idade menor ou igual a 25 anos, com raça/cor preta, parda ou indígena, que cursaram até o ensino médio, em relacionamento estável, sexualmente ativas, que referiram ter apresentado a menarca até os 15 anos de idade e o primeiro intercuro sexual após os 15 anos, que disseram estar com a libido mantida, terem mantido relações sexuais com menos de cinco parceiros na vida e um ou mais nos três meses anteriores à consulta. Além disso, a maior parte destas mulheres referiu o uso ocasional ou raro do preservativo e não relataram dispareunia, sinusiorragia ou disúria. Outros aspectos como dor pélvica, prurido, corrimento e motivo da consulta apresentaram variação na distribuição das mulheres infectadas (Tabela 4).

5.4.2 Perfil clínico-demográfico da população testada para a presença de molicutes nas amostras de swab genital

Ao ser analisado o perfil da população estudada para a presença de molicutes, foi encontrada associação positiva entre a presença destes microrganismos e as mulheres vivendo na região rural (Odds Ratio (OR) 2,64, 95% IC 1,24 - 5,62, $p = 0,01$), em relacionamento estável (Odds Ratio (OR) 0,64, 95% IC 0,26 - 0,90, $p = 0,02$), com vida sexualmente ativa (Odds Ratio (OR) 3,74, 95% IC 1,64 - 8,50, $p = 0,001$) e com um ou mais parceiros sexuais nos últimos três meses (Odds Ratio (OR) 4,26, 95% IC 2,09 - 8,69, $p < 0,001$). As demais análises não apresentaram associação significativa com a presença dos molicutes na população (Tabela 5).

Tabela 4 – Perfil das mulheres com amostras de swab vaginal com resultado de PCR e qPCR positivo para Mollicutes, *M. hominis* e *M. genitalium*, atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista - BA, 2011.
(continua)

Variáveis	PCR genérica	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>M. genitalium</i>
	Positiva	cPCR	qPCR	cPCR	qPCR
	N = 230	N = 48	N = 96	N = 5	N = 85
	n (%) [*]	n (%) [*]	n (%) [*]	n (%) [*]	n (%) [*]
Dados Demográficos					
Região					
Rural	63 (27,4)	14 (29,2)	21 (21,9)	0 (0,0)	38 (44,7)
Urbana	167 (72,6)	34 (70,8)	75 (78,1)	5 (100,0)	47 (55,3)
Motivo da Consulta					
Sintomático	162 (70,4)	28 (58,3)€	30 (31,2)§	4 (80,0)	32 (37,6)‡
Rotina	64 (27,8) ¹	19 (39,6)	64 (66,7)	1 (20,0)	50 (58,8)
Idade					
< 25 anos	42 (18,3)	11 (22,9)	23 (24,0)	0 (0,0)	15 (17,6)
≥ 25 anos	188 (81,7)	37 (77,1)	73 (76,0)	5 (100,0)	70 (82,4)
Raça/Cor					
Preta/Parda/Indígena	172 (74,8)	39 (81,2)	78 (81,2)	3 (60,0)	66 (77,6)
Branca/Amarela	58 (25,2)	9 (18,8)	18 (18,8)	2 (40,0)	19 (22,4)
Escolaridade					
< Ensino Médio	161 (70,0) ²	38 (79,2)¥	73 (76,0)§	3 (60,0)	61 (71,8)€
≥ Ensino Médio	57 (24,8)	8 (16,7)	22 (22,9)	2 (40,0)	23 (27,1)
Relação estável					
Não	41 (17,8)	11 (22,9)	24 (25,0)	1 (20,0)	17 (20,0)
Sim	189 (82,2)	37 (77,1)	72 (75,0)	4 (80,0)	68 (80,0)
Saúde Sexual					
Menarca					
< 15 anos	176 (76,5)	36 (75,0)	71 (74,0)	5 (100,0)	68 (80,0)
≥ 15 anos	54 (23,5)	12 (25,0)	25 (26,0)	0 (0,0)	17 (20,0)
Primeira relação sexual					
≤ 15 anos	54 (23,5)	19 (39,6)	28 (29,2)	1 (20,0)	21 (24,7)
> 15 anos	176 (76,5)	29 (60,4)	68 (70,8)	4 (80,0)	64 (75,3)
Vida Sexual					
Ativa	217 (94,3)	46 (95,8)	92 (95,8)	5 (100,0)	81 (95,3)
Inativa	13 (5,7)	2 (4,2)	4 (4,2)	0 (0,0)	4 (4,7)
Libido					
Diminuída	100 (43,5) ⁶	21 (44,7)€	43 (44,8)§	2 (40,0)	36 (42,4)€
Mantida	128 (55,7)	26 (55,3)	52 (54,2)	3 (60,0)	48 (56,5)
Nº Parceiros na Vida					
≥ 5	21 (9,1)	2 (4,2)	9 (9,4)	0 (0,0)	10 (11,8)
< 5	209 (90,9)	46 (95,8)	87 (90,6)	5 (100,0)	75 (88,2)
Nº Parc. últ. 3 meses †					
≥ 1	210 (91,3) ³	44 (91,7)€	87 (90,6)§	5 (100,0)	78 (91,8)‡
Nenhum	18 (7,8)	3 (6,2)	8 (8,3)	0 (0,0)	5 (5,9)
Uso de Condom					
Raro/Ocasional	192 (83,5) ⁴	44 (91,7)£	80 (83,3)	5 (100,0)	70 (82,4)‡
Sempre	31 (13,5)	4 (8,3)	13 (13,5)	0 (0,0)	12 (14,1)

Tabela 4 – Perfil das mulheres com amostras de swab vaginal com resultado de PCR e qPCR positivo para Mollicutes, *M. hominis* e *M. genitalium*, atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista - BA, 2011. (conclusão)

Variáveis	PCR genérica	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>M. genitalium</i>
	Positiva	cPCR	qPCR	cPCR	qPCR
	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva
	N = 230	N = 48	N = 96	N = 5	N = 85
	n (%) [*]	n (%) [*]	n (%) [*]	n (%) [*]	n (%) [*]
Contracep. Hormonal [¶]					
Sim	86 (37,4) ⁵	16 (33,3) [€]	32 (33,3) [§]	4 (80,0)	34 (40,0)
Não	140 (60,9)	31 (64,6)	62 (64,6)	1 (20,0)	50 (58,8) [£]
Dispareunia					
Sim	75 (32,6)	18 (37,5)	28 (29,2)	2 (40,0)	24 (28,2) [†]
Não	150 (65,2)	28 (58,3)	65 (67,7)	3 (60,0)	59 (69,4)
Sinusiorragia					
Sim	20 (8,7)	7 (14,6)	9 (9,4) [§]	1 (20,0)	8 (9,4) [†]
Não	206 (89,6)	41 (85,4)	86 (89,6)	4 (80,0)	75 (88,2)
Disúria					
Sim	49 (21,3)	4 (8,3)	17 (17,7)	2 (40,0)	20 (23,5)
Não	181 (78,7)	44 (91,7)	79 (82,3)	3 (60,0)	65 (76,5)
Dor Pélvica					
Sim	105 (45,7)	24 (50,0)	43 (44,8)	3 (60,0)	43 (50,6)
Não	125 (54,3)	24 (50,0)	53 (55,2)	2 (40,0)	42 (49,4)
Prurido					
Sim	69 (30,0)	7 (14,6)	27 (28,1)	3 (60,0)	35 (41,2)
Não	161 (70,0)	41 (85,4)	69 (71,9)	2 (40,0)	50 (58,8)
Corrimento					
Sim	106 (46,1)	27 (56,2)	43 (44,8) [§]	2 (40,0)	48 (56,5) [£]
Não	123 (53,5)	21 (43,8)	52 (54,2)	3 (60,0)	36 (42,4)
Sinais e Sintomas					
Sim	185 (80,4) ⁷	39 (81,2)	73 (76,0)	4 (80,0)	76 (89,4)
Não	44 (19,1)	9 (18,8)	23 (24,0)	1 (20,0)	9 (10,6)

Nota: Perda de observação: ¹Motivo da consulta: perda de 4 (n=226); ²Escolaridade: perda de 12 (n=218); ³Número de Parc. Últim. 3 meses: perda de 2 (n=228); ⁴Uso de condom: perda de 7 (n=223); ⁵Contracep. hormonal: perda de 4 (n=226); ⁶Libido: Perda de 2 (n=228); ⁷Sinais e sintomas: perda de 1. [€]Motivo da consulta, Libido, Número de Parceiros nos Últimos 3 meses, Contracep. Hormonal: perda de 1 (n=47). [¥]Escolaridade: Perda de 2 (n=46). [§]Escolaridade, Sinusiorragia, Corrimento, Libido e Número de Parc. Últim. 3 meses: Perda de 1. [§]Motivo da consulta e Contracep. Hormonal: Perda de 2. [£]Uso de condom: Perda de 3. [£]Escolaridade, Libido, Contracep. Hormonal e Corrimento: Perda de 1. [†]Número de Parceiros nos Últimos 3 meses, Dispareunia e Sinusiorragia: Perda de 2. [©]Uso de condom: Perda de 3.

*Perfil da população total do estudo com resultado positivo na PCR para Mollicutes e PCR e qPCR para *M. hominis* e *M. genitalium*.

† Número de parceiros nos últimos três meses.

¶ Contracepção Hormonal.

Tabela 5 – Detecção de Mollicutes por meio da PCR convencional em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(continua)

Variáveis	PCR-Positiva	PCR-Negativa	Odds	IC 95%	p [¶]
	N = 230	N = 72	Ratio		
	n (%) [*]	n (%) [†]	(bruta)		
Dados Demográficos					
Região					
Rural	63 (27,4)	9 (12,5)	2,64	[1,24; 5,62]	0,010
Urbana	167 (72,6)	63 (87,5)	1		
Motivo da Consulta ⁵					
Sintomático	64 (28,3)	22 (30,6)	0,89	[0,50; 1,60]	0,715
Rotina	162 (71,7)	50 (69,4)	1		
Idade					
< 25 anos	42 (18,3)	10 (13,9)	1,38	[0,65; 2,92]	0,391
≥ 25 anos	188 (81,7)	62 (86,1)	1		
Raça/Cor					
Preta/Parda/Indígena	172 (74,8)	54 (75,0)	0,98	[0,53; 1,82]	0,970
Branca/Amarela	58 (25,2)	18 (25,0)	1		
Escolaridade					
< Ensino Médio	161 (73,9)	44 (63,8)	1,60	[0,90; 2,85]	0,106
≥ Ensino Médio	57 (26,1)	25 (36,2)	1		
Relação estável					
Não	41 (17,8)	22 (30,6)	0,49	[0,26; 0,90]	0,020
Sim	189 (82,2)	50 (69,4)	1		
Saúde Sexual					
Menarca					
< 15 anos	176 (76,5)	62 (86,1)	0,52	[0,25; 1,09]	0,082
≥ 15 anos	54 (23,5)	10 (13,9)	1		
Primeira relação sexual					
≤ 15 anos	54 (23,5)	18 (25,0)	0,92	[0,49; 1,70]	0,791
> 15 anos	176 (76,5)	54 (75,0)	1		
Vida Sexual ¹					
Ativa	217 (94,3)	58 (81,7)	3,74	[1,64; 8,50]	0,001
Inativa	13 (5,7)	13 (18,3)	1		
Libido					
Diminuída	100 (43,9)	34 (47,9)	0,85	[0,49; 1,45]	0,551
Mantida	128 (56,1)	37 (52,1)	1		
Nº Parceiros na Vida					
≥ 5	21 (9,1)	6 (8,5)	1,08	[0,42; 2,81]	0,86
< 5	209 (90,9)	65 (91,5)	1		
Nº Parc. últ. 3 meses ‡					
≥ 1	210 (92,1)	52 (73,2)	4,26	[2,09; 8,69]	< 0,001
Nenhum	18 (7,9)	19 (26,8)	1		
Uso de Condom					
Raro/Ocasional	192 (86,1)	59 (84,3)	1,15	[0,54; 2,43]	0,706
Sempre	31 (13,9)	11 (15,7)	1		
Contracep. Hormonal ¶					
Sim	86 (38,1)	24 (33,8)	1,20	[0,68; 2,10]	0,518
Não	140 (61,9)	47 (66,2)	1		

Tabela 5 – Detecção de Mollicutes por meio da PCR convencional em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(conclusão)

Variáveis	PCR-Positiva	PCR-Negativa	Odds		
	N = 230	N = 72	Ratio	IC 95%	p [¶]
	n (%) [*]	n (%) [†]			
Dispareunia²					
Sim	75 (33,3)	17 (25,4)	1,47	[0,79; 2,72]	0,218
Não	150 (66,7)	50 (74,6)	1		
Sinusiorragia³					
Sim	20 (8,8)	6 (9,0)	0,98	[0,37; 2,56]	0,979
Não	206 (91,2)	61 (91,0)	1		
Disúria					
Sim	49 (21,3)	15 (20,8)	1,02	[0,53; 1,97]	0,932
Não	181 (78,7)	57 (79,2)	1		
Dor Pélvica					
Sim	105 (45,7)	30 (41,7)	1,17	[0,68; 2,00]	0,553
Não	125 (54,3)	42 (58,3)	1		
Prurido					
Sim	69 (30,0)	21 (29,2)	1,04	[0,58; 1,86]	0,893
Não	161 (70,0)	51 (70,8)	1		
Corrimento⁴					
Sim	106 (46,3)	28 (38,9)	1,35	[0,78; 2,32]	0,270
Não	123 (53,7)	44 (61,1)	1		

Nota: Perda de observação: ¹vida sexual: perda de 1 (n= 301); ²Dispareunia: perda de 10 e excluídas mulheres com vida sexual inativa. (n=292); ³Sinusiorragia: perda de 9 e excluídas mulheres com vida sexual inativa (n=293); ⁴Corrimento: perda de 1 (n=301); ⁵Motivo da consulta: perda de 4 (n=298).

*Perfil da população total do estudo com resultado de PCR positivo para Mollicutes.

† Perfil da população total do estudo com resultado de PCR negativo para Mollicutes.

‡ Número de parceiros nos últimos três meses.

¶ Contracepção Hormonal.

¶ p valor: significativo quando $\leq 0,05$.

5.4.3 Perfil clínico-demográfico da população estudada para a presença de *M. hominis* nas amostras de swab genital testadas por meio da PCR convencional

Ao ser analisado o perfil clínico-demográfico das mulheres para a presença de *M. hominis*, foi encontrada associação positiva entre a presença desta espécie e as mulheres que iniciaram a vida sexual antes dos 15 anos de idade (Odds Ratio (OR) 2,48, 95% IC 1,29 - 4,77, $p = 0,005$); que relataram disúria (Odds Ratio (OR) 0,29, 95% IC 0,10 - 0,85, $p = 0,017$) e prurido (Odds Ratio (OR) 0,35, 95% IC 0,15 - 0,81, $p = 0,012$). Os outros fatores clínicos e demográficos não apresentaram associação significativa com a presença dos *M. hominis* na população estudada (Tabela 6)

5.4.4 Perfil clínico-demográfico da população estudada para a presença de *M. hominis* nas amostras de swab genital testadas por meio da PCR quantitativa (qPCR)

O perfil clínico-demográfico das mulheres também foi comparado para a presença de *M. hominis* obtida pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) e, após análise, foi encontrada associação positiva apenas entre a presença da espécie e as mulheres com idade inferior a 25 anos (Odds Ratio (OR) 1,92, 95% IC 1,04 - 3,54, $p = 0,034$). Diferente, portanto, do perfil encontrado quando analisados os dados da PCR convencional em que outros fatores apresentaram relação positiva com os achados da detecção da espécie (Tabela 7).

Tabela 6 – Detecção de *M. hominis* por meio da PCR convencional em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(continua)

Variáveis	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	P [¥]
	PCR-Positivo	PCR-Negativo			
	N = 48	N = 254			
	n (%) [*]	n (%) [†]			
Dados Demográficos					
Região					
Rural	14 (29,2)	58 (22,8)	1,39	[0,69; 2,76]	0,345
Urbana	34 (70,8)	196 (77,2)	1		
Motivo da Consulta⁵					
Sintomático	19 (40,4)	67 (26,7)	1,86	[0,97; 3,55]	0,057
Rotina	28 (59,6)	184 (73,3)	1		
Idade					
< 25 anos	11 (22,9)	41 (16,1)	1,54	[0,72; 3,27]	0,254
≥ 25 anos	37 (77,1)	213 (83,9)	1		
Raça/Cor					
Preta/Parda/Indígena	39 (81,2)	187 (73,6)	1,55	[0,71; 3,37]	0,264
Branca/Amarela	9 (18,8)	67 (26,4)	1		
Escolaridade					
< Ensino Médio	38 (82,6)	167 (69,3)	2,10	[0,93; 4,73]	0,067
≥ Ensino Médio	8 (17,4)	74 (30,7)	1		
Relação estável					
Não	11 (22,9)	52 (20,5)	1,15	[0,55; 2,41]	0,702
Sim	37 (77,1)	202 (79,5)	1		
Saúde Sexual					
Menarca					
< 15 anos	36 (75,0)	202 (79,5)	0,77	[0,37; 1,58]	0,481
≥ 15 anos	12 (25,0)	52 (20,5)	1		
Primeira relação sexual					
≤ 15 anos	19 (39,6)	53 (20,9)	2,48	[1,29; 4,77]	0,005
> 15 anos	29 (60,4)	201 (79,1)	1		
Vida Sexual¹					
Ativa	46 (95,8)	229 (90,5)	2,41	[0,55; 10,55]	0,229
Inativa	2 (4,2)	24 (9,5)	1		
Libido					
Diminuída	21 (44,7)	113 (44,8)	0,99	[0,53; 1,85]	0,984
Mantida	26 (55,3)	139 (55,2)	1		
Nº Parceiros na Vida					
≥ 5	2 (4,2)	25 (9,9)	0,37	[0,09; 1,73]	0,204
< 5	46 (95,8)	228 (90,1)	1		
Nº Parc. últ. 3 meses[‡]					
≥ 1	44 (93,6)	218 (86,5)	2,28	[0,67; 7,78]	0,174
Nenhum	3 (6,4)	34 (13,5)	1		
Uso de Condôm					
Raro/Ocasional	44 (91,7)	207 (84,5)	2,01	[0,68; 5,94]	0,194
Sempre	4 (8,3)	38 (15,5)	1		

Tabela 6 – Detecção de *M. hominis* por meio da PCR convencional em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(conclusão)

Variáveis	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	P [¥]
	PCR-Positivo	PCR-Negativo			
	N = 48	N = 254			
	n (%) [*]	n (%) [†]			
Contracep. Hormonal[‡]					
Sim	16 (34,0)	94 (37,6)	0,85	[0,44; 1,65]	0,643
Não	31 (66,0)	156 (62,4)	1		
Dispareunia²					
Sim	18 (39,1)	74 (30,1)	1,49	[0,77; 2,86]	0,225
Não	28 (60,9)	172 (69,9)	1		
Sinusiorragia³					
Sim	7 (14,6)	19 (7,8)	2,03	[0,80; 5,13]	0,128
Não	41 (85,4)	226 (92,2)	1		
Disúria					
Sim	4 (8,3)	60 (23,6)	0,29	[0,10; 0,85]	0,017
Não	44 (91,7)	194 (76,4)	1		
Dor Pélvica					
Sim	24 (50,0)	111 (43,7)	1,28	[0,69; 2,38]	0,421
Não	24 (50,0)	143 (56,3)	1		
Prurido					
Sim	7 (14,6)	83 (32,7)	0,35	[0,15; 0,81]	0,012
Não	41 (85,4)	171 (67,3)	1		
Corrimento⁴					
Sim	27 (56,2)	107 (42,3)	1,75	[0,94; 3,26]	0,074
Não	21 (43,8)	146 (57,7)	1		

Nota: Perda de observação: ¹vida sexual: perda de 1 (n= 301); ²Dispareunia: perda de 10 e excluídas mulheres com vida sexual inativa. (n=292); ³Sinusiorragia: perda de 9 e excluídas mulheres com vida sexual inativa (n=293); ⁴Corrimento: perda de 1 (n=301); ⁵Motivo da consulta: perda de 4 (n=298).

*Perfil da população total do estudo com resultado de PCR positivo para *M. hominis*.

† Perfil da população total do estudo com resultado de PCR negativo para *M. hominis*.

‡ Número de parceiros nos últimos três meses.

‡ Contracepção Hormonal.

¥ p valor: significativo quando ≤ 0,05.

Tabela 7 – Detecção de *M. hominis* por meio da PCR em tempo real (qPCR) em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(continua)

Variáveis	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ^y
	qPCR-Positivo	qPCR-Negativo			
	N = 96	N = 206			
	n (%) [*]	n (%) [†]			
Dados Demográficos					
Região					
Rural	21 (21,9)	51 (24,8)	0,85	[0,47; 1,51]	0,584
Urbana	75 (78,1)	155 (75,2)	1		
Motivo da Consulta ⁵					
Sintomático	30 (31,9)	56 (27,5)	1,23	[0,72; 2,10]	0,429
Rotina	64 (68,1)	148 (72,5)	1		
Idade					
< 25 anos	23 (24,0)	29 (14,1)	1,92	[1,04; 3,54]	0,034
≥ 25 anos	73 (76,0)	177 (85,9)	1		
Raça/Cor					
Preta/Parda/Indígena	78 (81,2)	148 (71,8)	1,69	[0,93; 3,08]	0,079
Branca/Amarela	18 (18,8)	58 (28,2)	1		
Escolaridade					
< Ensino Médio	73 (76,8)	132 (68,8)	1,50	[0,85; 2,65]	0,153
≥ Ensino Médio	22 (23,2)	60 (31,2)	1		
Relação estável					
Não	24 (25,0)	39 (18,9)	1,47	[0,80; 2,54]	0,227
Sim	72 (75,0)	167 (81,1)	1		
Saúde Sexual					
Menarca					
< 15 anos	71 (74,0)	167 (81,1)	0,66	[0,37; 1,17]	0,159
≥ 15 anos	25 (26,0)	39 (18,9)	1		
Primeira relação sexual					
≤ 15 anos	28 (29,2)	44 (21,4)	1,51	[0,87; 2,63]	0,138
> 15 anos	68 (70,8)	162 (78,6)	1		
Vida Sexual ¹					
Ativa	92 (95,8)	183 (89,3)	2,76	[0,92; 8,26]	0,059
Inativa	4 (4,2)	22 (10,7)	1		
Libido					
Diminuída	43 (45,3)	91 (44,6)	1,02	[0,63; 1,67]	0,916
Mantida	52 (54,7)	113 (55,4)	1		
Nº Parceiros na Vida					
≥ 5	9 (9,4)	18 (8,8)	1,07	[0,46; 2,48]	0,866
< 5	87 (90,6)	187 (91,2)	1		
Nº Parc. últ. 3 meses [‡]					
≥ 1	87 (91,6)	175 (85,8)	1,80	[0,79; 4,10]	0,157
Nenhum	8 (8,4)	29 (14,2)	1		
Uso de Condom					
Raro/Ocasional	80 (86,0)	171 (85,5)	1,04	[0,51; 2,11]	0,906
Sempre	13 (14,0)	29 (14,5)	1		

Tabela 7 – Detecção de *M. hominis* por meio da PCR em tempo real (qPCR) em amostras de swab vaginal e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(conclusão)

Variáveis	<i>M. hominis</i>	<i>M. hominis</i>	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p [¥]
	qPCR-Positivo	qPCR-Negativo			
	N = 96	N = 206			
	n (%) [*]	n (%) [†]			
Contracep. Hormonal[¶]					
Sim	32 (34,0)	78 (38,4)	0,82	[0,49; 1,38]	0,467
Não	62 (66,0)	125 (61,6)	1		
Dispareunia²					
Sim	28 (30,1)	64 (32,2)	0,90	[0,53; 1,54]	0,725
Não	65 (69,9)	135 (67,8)	1		
Sinusiorragia³					
Sim	9 (9,5)	17 (8,6)	1,11	[0,47; 2,60]	0,802
Não	86 (90,5)	181 (91,4)	1		
Disúria					
Sim	17 (17,7)	47 (22,8)	0,72	[0,39; 1,34]	0,312
Não	79 (82,3)	159 (77,2)	1		
Dor Pélvica					
Sim	43 (44,8)	92 (44,7)	1,01	[0,61; 1,63]	0,983
Não	53 (55,2)	114 (55,3)	1		
Prurido					
Sim	27 (28,1)	63 (30,6)	0,88	[0,52; 1,51]	0,664
Não	69 (71,9)	143 (69,4)	1		
Corrimento⁴					
Sim	43 (45,3)	91 (44,2)	1,04	[0,64; 1,70]	0,860
Não	52 (54,7)	115 (55,8)	1		

Nota: Perda de observação: ¹vida sexual: perda de 1 (n= 301); ²Dispareunia: perda de 10 e excluídas mulheres com vida sexual inativa. (n=292); ³Sinusiorragia: perda de 9 e excluídas mulheres com vida sexual inativa (n=293); ⁴Corrimento: perda de 1 (n=301); ⁵Motivo da consulta: perda de 4 (n=298).

*Perfil da população total do estudo com resultado positivo para *M. hominis* na qPCR.

† Perfil da população total do estudo com resultado negativo para *M. hominis* na qPCR.

‡ Número de parceiros nos últimos três meses.

¶ Contracepção Hormonal.

¥ p valor: significativo quando ≤ 0,05.

5.4.5 Perfil clínico-demográfico da população estudada para a presença de *M. genitalium* nas amostras de swab genital testadas por meio da PCR em tempo real (qPCR)

Ao comparar o perfil clínico-demográfico das mulheres para a presença de *M. genitalium* indicada também pela técnica de PCR em tempo real (qPCR), foi encontrada associação positiva entre a presença da espécie e as mulheres vivendo na zona rural (Odds Ratio (OR) 4,35, 95% IC 2,47 - 7,64, $p < 0,001$), que foram a consulta por motivo sintomático (Odds Ratio (OR) 1,29, 95% IC 1,11 - 3,29, $p < 0,017$), com um parceiro ou mais nos últimos três meses (Odds Ratio (OR) 2,71, 95% IC 1,01 - 7,22, $p = 0,039$), que referiram prurido (Odds Ratio (OR) 2,06, 95% IC 1,21 - 3,50, $p = 0,007$) e com corrimento (Odds Ratio (OR) 2,03, 95% IC 1,21 - 3,38, $p = 0,006$). As demais variáveis clínico-demográficas não apresentaram associação estatisticamente significativa (Tabela 8).

5.4.6 Perfil das mulheres com ou sem sinais e/ou sintomas em relação à presença de *Mollicutes*, *M. hominis* ou *M. genitalium* detectados por PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR)

Ao estratificar em dois grupos as mulheres que referiram sintomas e/ou apresentaram sinais de infecção urogenital com aquelas que não tinham nenhum dos dois fatores, foi possível analisar a relação com os achados para as duas técnicas de PCR. Associação positiva apenas entre a presença da espécie *M. genitalium* (Odds Ratio (OR) 2,90, 95% IC 1,36 - 6,18, $p = 0,004$). Para a espécie *M. hominis* e para a presença de microrganismos da classe *Mollicutes* não foi encontrada associação significativa (Tabela 9).

Tabela 8 – Detecção de *M. genitalium* por meio da PCR em tempo real (qPCR), em amostras de swab vaginal, e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(continua)

Variáveis	M. genitalium	M. genitalium	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ^y
	qPCR-Positivo	qPCR-Negativo			
	N = 85	N = 217			
	n (%) [*]	n (%) [†]			
Dados Demográficos					
Região					
Rural	38 (44,7)	34 (15,7)	4,35	[2,47; 7,64]	< 0,001
Urbana	47 (55,3)	183 (84,3)	1		
Motivo da Consulta ⁵					
Sintomático	32 (39,0)	54 (25,0)	1,29	[1,11; 3,29]	0,017
Rotina	50 (61,0)	162 (75,0)	1		
Idade					
< 25 anos	15 (17,6)	37 (17,1)	1,04	[0,53; 2,01]	0,902
≥ 25 anos	70 (82,4)	180 (82,9)	1		
Raça/Cor					
Preta/Parda/Indígena	66 (77,6)	160 (73,7)	1,23	[0,68; 2,23]	0,480
Branca/Amarela	19 (22,4)	57 (26,3)	1		
Escolaridade					
< Ensino Médio	61 (72,6)	144 (70,9)	1,08	[0,61; 1,91]	0,774
≥ Ensino Médio	23 (27,4)	59 (29,1)	1		
Relação estável					
Não	17 (20,0)	46 (21,2)	0,92	[0,49; 1,73]	0,818
Sim	68 (80,0)	171 (78,8)	1		
Saúde Sexual					
Menarca					
< 15 anos	68 (80,0)	170 (78,3)	1,10	[0,59; 2,06]	0,751
≥ 15 anos	17 (20,0)	47 (21,7)	1		
Primeira relação sexual					
≤ 15 anos	21 (24,7)	51 (23,5)	1,06	[0,59; 1,91]	0,825
> 15 anos	64 (75,3)	166 (76,5)	1		
Vida Sexual ¹					
Ativa	81 (95,3)	194 (89,8)	2,29	[0,76; 6,87]	0,128
Inativa	4 (4,7)	22 (10,2)	1		
Libido					
Diminuída	36 (42,9)	98 (45,6)	0,89	[0,53; 1,48]	0,670
Mantida	48 (57,1)	117 (54,4)	1		
Nº Parceiros na Vida					
≥ 5	10 (11,8)	17 (7,9)	1,56	[0,68; 3,56]	0,287
< 5	75 (88,2)	199 (92,1)	1		
Nº Parc. últ. 3 meses [‡]					
≥ 1	78 (94,0)	184 (85,2)	2,71	[1,01; 7,22]	0,039
Nenhum	5 (6,0)	32 (14,8)	1		
Uso de Condom					
Raro/Ocasional	70 (85,4)	181 (85,8)	0,96	[0,46; 1,99]	0,927
Sempre	12 (14,6)	30 (14,2)	1		

Tabela 8 – Detecção de *M. genitalium* por meio da PCR em tempo real (qPCR), em amostras de swab vaginal, e sua relação com o perfil clínico-demográfico da população de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(conclusão)

Variáveis	<i>M. genitalium</i> qPCR-Positivo	<i>M. genitalium</i> qPCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p [¥]
	N = 85	N = 217			
	n (%) [*]	n (%) [†]			
Contracep. Hormonal [¶]					
Sim	34 (40,5)	76 (35,7)	1,22	[0,73; 2,05]	0,441
Não	50 (59,5)	137 (64,3)	1		
Dispareunia²					
Sim	24 (28,9)	68 (32,5)	0,84	[0,48; 1,47]	0,548
Não	59 (71,1)	141 (67,5)	1		
Sinusiorragia³					
Sim	8 (9,6)	18 (8,6)	1,13	[0,47; 2,72]	0,772
Não	75 (90,4)	192 (91,4)	1		
Disúria					
Sim	20 (23,5)	44 (20,3)	1,21	[0,66; 2,20]	0,534
Não	65 (76,5)	173 (79,7)	1		
Dor Pélvica					
Sim	43 (50,6)	92 (42,4)	1,39	[0,84; 2,30]	0,198
Não	42 (49,4)	125 (57,6)	1		
Prurido					
Sim	35 (41,2)	55 (25,3)	2,06	[1,21; 3,50]	0,007
Não	50 (58,8)	162 (74,7)	1		
Corrimento⁴					
Sim	48 (57,1)	86 (39,6)	2,03	[1,21; 3,38]	0,006
Não	36 (42,9)	131 (60,4)	1		

Nota: Perda de observação: ¹vida sexual: perda de 1 (n= 301); ²Dispareunia: perda de 10 e excluídas mulheres com vida sexual inativa. (n=292); ³Sinusiorragia: perda de 9 e excluídas mulheres com vida sexual inativa (n=293); ⁴Corrimento: perda de 1 (n=301); ⁵Motivo da consulta: perda de 4 (n=298).

*Perfil da população total do estudo com resultado positivo para *M. genitalium* na qPCR.

† Perfil da população total do estudo com resultado negativo para *M. genitalium* na qPCR.

‡ Número de parceiros nos últimos três meses.

¶ Contracepção Hormonal.

¥ p valor: significativo quando ≤ 0,05.

Tabela 9 – Perfil das mulheres com e sem sinais e/ou sintomas em relação à presença de Mollicutes, *M. hominis* ou *M. genitalium* detectados por PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR) em amostras de swab vaginal de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

PCR	Sinais e Sintomas	Sinais e Sintomas	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p [¥]
	Positivo	Negativo			
	N = 236†	N = 64†			
	n (%) [*]	n (%) [†]			
PCR <i>M. hominis</i>					
Positiva	39 (16,5)	9 (14,1)	1,21	[0,55; 2,65]	0,634
Negativa	197 (83,5)	55 (85,9)	1		
qPCR <i>M. hominis</i>					
Positiva	73 (30,9)	23 (35,9)	0,79	[0,44; 1,42]	0,446
Negativa	163 (69,1)	41 (64,1)	1		
qPCR <i>M. genitalium</i>					
Positiva	76 (32,2)	9 (14,1)	2,90	[1,36; 6,18]	0,004
Negativa	160 (67,8)	55 (85,9)	1		
PCR Genérica					
Positiva	185 (78,4)	44 (68,8)	1,64	[0,89; 3,04]	0,108
Negativa	51 (21,6)	20 (31,2)	1		

Nota: †Perda de observação: 2 amostras (n = 300)

*Perfil da população com sinais e/ou sintomas

† Perfil da população sem sinais e/ou sintomas

¥ p valor: significativo quando $\leq 0,05$

5.4.7 Perfil clínico-demográfico das mulheres com e sem sinais e/ou sintomas

As mulheres foram separadas em dois grupos, com e sem sinais e/ou sintomas, o que permitiu analisar o perfil dos mesmos frente às variáveis clínico-demográficas. Desta maneira, diversas associações positivas foram encontradas. Entre o perfil das mulheres que referiram sintomas e/ou apresentavam sinais de infecção estavam aquelas que viviam na zona rural (Odds Ratio (OR) 3,03, 95% IC 1,31 - 6,98, $p = 0,007$); que buscaram o serviço de saúde por motivo sintomático (Odds Ratio (OR) 11,32, 95% IC 3,44 - 37,22, $p < 0,001$); com idade inferior a 25 anos (Odds Ratio (OR) 2,93, 95% IC 1,11 - 7,71, $p = 0,023$); que tiveram o primeiro intercurso sexual com idade menor ou igual a 15 anos (Odds Ratio (OR) 2,22, 95% IC 1,03 - 4,76, $p = 0,036$); com a vida sexualmente ativa (Odds Ratio (OR) 2,59, 95% IC 1,11 - 6,04, $p = 0,023$); com um ou mais parceiros sexuais nos últimos três meses (Odds Ratio (OR) 2,62, 95% IC 1,25; 5,45 $p = 0,008$); que utiliza algum contraceptivo hormonal (Odds Ratio (OR) 2,00, 95% IC 1,07 - 3,73, $p = 0,028$); que relatou

sinusiorragia (Odds Ratio (OR) 7,16, 95% IC 0,95 - 53,95, $p = 0,027$) e dor pélvica (Odds Ratio (OR) 4,05, 95% IC 2,09 - 7,85, $p < 0,001$). Além daquelas mulheres que apresentavam corrimento vaginal (Odds Ratio (OR) 80,7, 95% IC 11,0 - 591,9, $p < 0,001$) (Tabela 10).

Tabela 10 – Perfil clínico-demográfico das mulheres com e sem sinais e/ou sintomas de infecção urogenital atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(continua)

Variáveis	Sinais e Sintomas	Sinais e Sintomas	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p [¶]
	Positivo	Negativo			
	N = 236	N = 64			
	n (%) [*]	n (%) [†]			
Dados Demográficos					
Região €					
Rural	64 (27,1)	7 (10,9)	3,03	[1,31; 6,98]	0,007
Urbana	172 (72,9)	57 (89,1)	1		
Motivo da Consulta ¹					
Sintomático	83 (35,8)	3 (4,7)	11,32	[3,44; 37,22]	< 0,001
Rotina	149 (64,2)	61 (95,3)	1		
Idade €					
< 25 anos	47 (19,9)	5 (7,8)	2,93	[1,11; 7,71]	0,023
≥ 25 anos	189 (80,1)	59 (92,2)	1		
Raça/Cor €					
Preta/Parda/Indígena	175 (74,2)	51 (79,7)	0,73	[0,37; 1,43]	0,362
Branca/Amarela	61 (25,8)	13 (20,3)	1		
Escolaridade ²					
< Ensino Médio	159 (70,4)	44 (74,6)	0,80	[0,42; 1,55]	0,523
≥ Ensino Médio	67 (29,6)	15 (25,4)	1		
Relação estável €					
Não	47 (19,9)	16 (25,0)	0,74	[0,39; 1,42]	0,376
Sim	189 (80,1)	48 (75,0)	1		
Menarca €					
< 15 anos	189 (78,8)	50 (78,1)	1,04	[0,53; 2,03]	0,905
≥ 15 anos	50 (21,2)	14 (21,9)	1		
Saúde Sexual					
Primeira relação sexual €					
≤ 15 anos	63 (26,7)	9 (14,1)	2,22	[1,03; 4,76]	0,036
> 15 anos	173 (73,3)	55 (85,9)	1		
Vida Sexual ⁴					
Ativa	220 (93,2)	53 (84,1)	2,59	[1,11; 6,04]	0,023
Inativa	16 (6,8)	10 (15,9)	1		
Libido ³					
Diminuída	107 (45,5)	26 (41,9)	1,15	[0,65; 2,03]	0,612
Mantida	128 (54,5)	36 (58,1)	1		
Nº Parceiros na Vida ⁴					
≥ 5	25 (10,6)	2 (3,2)	3,61	[0,83; 15,68]	0,068
< 5	211 (89,4)	61 (96,8)	1		

Tabela 10 – Perfil clínico-demográfico das mulheres com e sem sinais e/ou sintomas de infecção urogenital atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

(conclusão)

Variáveis	Sinais e Sintomas	Sinais e Sintomas	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p [¥]
	Positivo	Negativo			
	N = 236 n (%) [*]	N = 64 n (%) [†]			
Nº Parc. últ. 3 meses[‡]					
≥ 1	211 (90,2)	49 (77,8)	2,62	[1,25; 5,45]	0,008
Nenhum	23 (9,8)	14 (22,2)	1		
Uso de Condom[§]					
Raro/Ocasional	196 (83,8)	53 (93,0)	0,38	[0,13; 1,13]	0,076
Sempre	38 (16,2)	4 (7,0)	1		
Contracep. Hormonal[¶]					
Sim	94 (40,5)	16 (25,4)	2,00	[1,07; 3,73]	0,028
Não	138 (59,5)	47 (74,6)	1		
Dispareunia[‡]					
Sim	90 (38,8)	0 (0,0)	nd	--	--
Não	142 (61,2)	58 (100,0)			
Sinusiorragia[§]					
Sim	25 (10,8)	1 (1,7)	7,16	[0,95; 53,95]	0,027
Não	206 (89,2)	59 (98,3)	1		
Disúria[€]					
Sim	63 (26,7)	0 (0,0)	nd	--	--
Não	173 (73,3)	64 (100,0)			
Dor Pélvica[€]					
Sim	120 (50,8)	13 (20,3)	4,05	[2,09; 7,85]	< 0,001
Não	116 (49,2)	51 (79,7)	1		
Prurido[€]					
Sim	89 (37,7)	0 (0,0)	nd	--	--
Não	147 (62,3)	64 (100,0)			
Corrimento[‡]					
Sim	132 (56,2)	1 (1,6)	80,7	[11,0; 591,9]	< 0,001
Não	103 (43,8)	63 (98,4)	1		

Nota: Perda de observação: ¹Motivo da consulta: perda de 6 (n=296); ²Escolaridade: perda de 17 (n=285); ³Libido e Número de Parceiros nos últimos 3 meses: perda de 5 (n=297); ⁴Corrimento, Vida sexual e Número de Parceiros na vida: perda de 3 (n=299); ⁵Sinusiorragia e mulheres sexualmente inativas: perda de 11 (n=291); ⁶Contracepção hormonal: perda de 7 (n= 295); ⁷Dispareunia e mulheres sexualmente inativas; ⁸Perda de 12 (n=290).

*Perfil das população com sinais e/ou sintomas.

† Perfil das população sem sinais e/ou sintomas.

‡ Número de parceiros nos últimos três meses.

¶ Contracepção Hormonal.

¥ p valor: significativo quando ≤ 0,05.

nd = Não definida

5.4.8 Análise Multivariada da detecção de *Mollicutes*, *M. hominis* e *M. genitalium* e sinais e sintomas nas mulheres atendidas

Com o objetivo de maximizar a função de verossimilhança do risco e descartar variáveis de confusão, empregou-se análise multivariada por regressão logística para avaliar a contribuição independente das variáveis associadas com a detecção de *Mollicutes*, *M. hominis*, *M. genitalium* e sinais e sintomas.

A região de residência da mulher (zona rural) e o fato desta ter relação com pelo menos um parceiro sexual nos últimos três meses foi associado ao maior risco de infecção por *Mollicutes*. Mulheres em relação estável e que tiveram a menarca até os 15 anos de idade têm estes dois fatores como protetores para infecções por *Mollicutes*. Para *M. hominis* houve maior risco associado com o motivo da consulta (sintomático), o grau de escolaridade (< ensino médio), a idade da primeira relação sexual (≤ 15 anos), a vida sexual ativa, a idade (< 25 anos) e a raça/cor (preta/parda/indígena) das mulheres. Para *M. genitalium*, o maior risco esteve associado à região de residência, ao número de parceiros sexuais nos últimos três meses, ao fato das mulheres terem sinais e/ou sintomas sugestivos de IST e com os sintomas corrimento e prurido. O risco aumentado aos sinais e sintomas foi associado à região de residência, ao número de parceiros sexuais nos últimos três meses, à idade, à idade da primeira relação sexual, à vida sexual e ao fato das mulheres referirem dor pélvica (Tabela 11).

Tabela 11 – Associações das variáveis com a detecção de Mollicutes, *M. hominis*, *M. genitalium* e sinais e sintomas em mulheres atendidas em postos de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011, preditos por regressão logística, N = 302.

(continua)

Modelo de Regressão Logística Multivariada	PCR genérica		PCR <i>M. hominis</i>		qPCR <i>M. hominis</i>		qPCR <i>M. genitalium</i>		Casos Sinais e Sint. [‡]	
	OR	95% IC	OR	95% IC	OR	95% IC	OR	95% IC	OR	95% IC
Região (Rural)	1,9	[0,8-4,2]	--	--	--	--	3,3	[1,8-6,1]	2,5	[1,0-6,2]
Relação estável	0,9	[0,4-2,1]	--	--	--	--	--	--	--	--
Menarca (< 15 anos)	0,5	[0,2-1,1]	--	--	--	--	--	--	--	--
Parceiro últ. 3 m. (≥ 1)	3,8	[1,6-9,4]	--	--	--	--	1,7	[0,6-4,9]	1,8	[0,5-5,9]
Motivo (Sintomático)	--	--	2,0	[0,9-4,3]	--	--	1,3	[0,7-2,4]	--	--
Escolaridade (< Ensino médio)	--	--	2,0	[0,8-4,9]	--	--	--	--	--	--
Primeira relação (≤ 15 anos)	--	--	2,9	[1,3-6,2]	--	--	--	--	1,6	[0,7-3,6]
Disúria	--	--	0,2	[0,06-0,7]	--	--	--	--	--	--
Prurido	--	--	0,2	[0,09-0,6]	--	--	1,6	[0,9-3,0]	--	--
Corrimento	--	--	1,4	[0,7-3,0]	--	--	1,5	[0,8-2,8]	--	--

Tabela 11 – Associações das variáveis com a detecção de Mollicutes, *M. hominis*, *M. genitalium* e sinais e sintomas em mulheres atendidas em postos de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011, preditos por regressão logística, N = 302.

(conclusão)

Modelo de Regressão Logística Multivariada	PCR genérica		PCR <i>M. hominis</i>		qPCR <i>M. hominis</i>		qPCR <i>M. genitalium</i>		Casos Sinais e Sint.†	
	OR	95% IC	OR	95% IC	OR	95% IC	OR	95% IC	OR	95% IC
Idade (< 25 anos)	--	--	--	--	1,7	[0,9-3,2]	--	--	1,2	[1,2-9,7]
Cor (preta/parda/indígena)	--	--	--	--	1,6	[0,9-3,0]	--	--	--	--
Vida sexual (Ativa)	--	--	--	--	2,5	[0,8-7,7]	--	--	1,2	[0,3-5,0]
Dor pélvica	--	--	--	--	--	--	--	--	4,1	[2,0-8,3]
Sinais e Sint.†	--	--	--	--	--	--	1,2	[0,4-3,0]	--	--
Contracep. horm.	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Nota: OR: Odds Ratio; CI: Intervalo de Confiança.

†Sinais e Sintomas.

5.5 Análise dos polimorfismos genômicos das citocinas

5.5.1 Detecção de polimorfismo genômico da Interleucina-1 β (IL-1 β) por meio da PCR RFLP

A detecção do polimorfismo genômico da IL-1 β , iniciou-se pela detecção do DNA alvo pela PCR gerando um produtos de 182 pb (Figura 12).

Figura 12 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados na PCR, da região gênica onde ocorre a mutação pontual, utilizando “primers” P1 e P2 com DNA das amostras de sangue coletadas das mulheres.

Legenda: Colunas 242 a 256 e de 259 a 267: amostras amplificadas; Coluna: 258: amostra não amplificada. PM: Peso Molecular (100 pb); C-: Controle Negativo.

Em seguida, o material amplificado foi digerido pela enzima de restrição TaqI. Três perfis de fragmentos eram esperados após a digestão: homozigoto TT com fragmento de 182 pb, homozigoto CC com dois fragmentos: uma de 97 pb e uma de 85 pb, e heterozigoto CT com três bandas: uma de 182 pb, uma de 97 pb e uma de 85 pb. Na Figura 13, os três perfis genéticos estão apresentados.

Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da PCR-RFLP evidenciando três perfis de polimorfismos genéticos da região gênica onde ocorre a mutação pontual na citocina IL-1 β .

Legenda: Colunas 242 a 249, 252 a 254, 256, 257, 259 e de 263 a 265: genótipo CC; Coluna: 250, 251 e de 260 a 262: genótipo CT; Coluna 255: genótipo TT. Coluna 258: amostra não amplificada. Legenda: TT (182 pb), CC (85pb e 97 pb) e CT (182 pb, 97 pb e 85 pb). Legenda: PM: Peso Molecular (100pb). PM: Peso Molecular (100 pb).

A Tabela 11 apresenta a frequência de cada genótipo encontrado nas amostras. O genótipo CC foi encontrado em maior parte da população estudada (63,6%), seguido pelo genótipo CT (34,4%) e por fim, em menor quantidade, o genótipo TT (2,0%).

5.5.2 Detecção de polimorfismo genômico da Interleucina-6 (IL-6) por meio da MS-PCR

Como descrito, para detecção do polimorfismo genético da IL-6, foi realizada a MS-PCR. A Figura 14 apresenta os perfis das bandas obtidos na reação correspondente a cada um dos genótipos (homozigoto CC com banda única de 136 pb, heterozigoto GC com duas bandas sendo uma de 121 pb e outra de 136 pb e o genótipo homozigoto GG com uma banda de 121 pb). A eletroforese ocorreu em gel de agarose a 4% para permitir melhor separação das bandas.

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos da MS-PCR evidenciando três perfis de polimorfismos genéticos da região gênica onde ocorre a mutação pontual na citocina IL-6.

Legenda: Colunas 239 a 244; 246, 247, 249 a 251, 253, 256 e 257: genótipo GG; Coluna: 238, 245, 248, 252 e 255: genótipo GC; Coluna 254: genótipo CC. Coluna 258: amostra não amplificada. Legenda: TT (182 pb), CC (85pb e 97 pb) e CT (182 pb, 97 pb e 85 pb). Legenda: CC (136pb), GC (136pb e 121pb) e GG (121pb). PM: Peso Molecular (100pb). C-: Controle Negativo. PM: Peso Molecular (100 pb).

A Tabela 12 apresenta a frequência de cada genótipo encontrado para expressão das interleucinas IL-6 e IL-1 β nas amostras de sangue coletadas. O genótipo GG foi encontrado na maioria da população estudada (61,9%), seguido pelo genótipo GC (32,8%) e o genótipo CC (5,3%) em menor quantidade. Os polimorfismos foram confirmados pelo sequenciamento dos fragmentos dos genes IL-6 e IL-1B como evidenciado na figura 15.

Tabela 12 – Frequência dos genótipos das interleucinas IL-6 e IL-1 β para seus respectivos polimorfismos encontrados em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Genótipo	IL-6	Genótipo	IL-1 β
	n (%)		n (%)
Homozigoto CC	16 (5,3)	Homozigoto CC	192 (63,6)
Homozigoto GG	187 (61,9)	Homozigoto TT	06 (2,0)
Heterozigoto GC	99 (32,8)	Heterozigoto CT	104 (34,4)

Nota: n = 302 amostras

Figura 15 – Eletroesferograma parcial da reação de sequenciamento dos fragmentos dos genes IL-6 e IL-1B evidenciando as regiões dos polimorfismos c – 174 C>G e c- + 3954 C>T.

Legenda: **a.** Indivíduo homozigoto GG para o gene IL-6 (+ 3954 C>T). **b.** Indivíduo homozigoto CC para o gene IL-6 + 3954 C>T. **c.** Indivíduo heterozigoto GC + 3954 C>T. **d.** Indivíduo homozigoto CC para o gene IL-1B – 174 C>G. **e.** Indivíduo homozigoto TT para o gene IL-1B – 174 C>G. **f.** Indivíduo heterozigoto CT para o gene IL-1B – 174 C>G.

5.5.3 Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) na população estudada e sua relação com a detecção dos diversos microrganismos por meio da PCR convencional e PCR em tempo real

Os dados nas tabelas 13, 14, 15 e 16 permitem analisar a relação de risco entre a presença dos vários microrganismos, detectados nas amostras clínicas pelas duas técnicas de PCR, e os polimorfismos das citocinas. São comparados os diferentes genótipos encontrados, atribuindo como desfecho de risco os indivíduos que apresentaram o genótipo diferente dos alelos dominantes (G para IL-6 e C para IL-1 β). Feito isto, foi observado que não houve associação estatisticamente significativa entre os genótipos em praticamente todos os microrganismos, exceto para *Chlamydia trachomatis* em que teve relação significativa com o genótipo TT de IL-1 β (Odds Ratio (OR) 19,00, 95% IC 1,47; 245,64, $p = 0,002$).

5.5.4 Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) na população estudada e sua relação com a presença ou ausência de sinais e sintomas relatados

Os dados na Tabela 17 apresentam a análise de risco entre a presença de sinais e/ou sintomas na população estudada, e os polimorfismos das citocinas. São comparados os diferentes genótipos encontrados, atribuindo como desfecho de risco os indivíduos que apresentaram o genótipo diferente dos alelos dominantes (G para IL-6 e C para IL-1 β). Como evidenciado, os resultados não foram estatisticamente significantes para associação positiva entre os fatores.

Tabela 13 – Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a detecção de *M. hominis* por meio da PCR convencional e PCR em tempo real, em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Interleucina	<i>M. hominis</i> PCR-Positivo	<i>M. hominis</i> PCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ¥	<i>M. hominis</i> qPCR-Positivo	<i>M. hominis</i> qPCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ¥
	n (%) [*]	n (%) [†]				n (%) [*]	n (%) [†]			
IL-6(1)										
CC	2 (12,5)	14 (87,5)	1,08	[0,23; 5,04]	0,922	6 (37,5)	10 (62,5)	1,40	[0,48; 4,04]	0,529
GG	25 (13,4)	162 (86,6)	1			56 (29,9)	131 (70,1)	1		
IL-6(2)										
GC	21 (21,2)	78 (78,8)	0,57	[0,30; 1,08]	0,086	34 (34,3)	65 (65,7)	1,22	[0,72; 2,05]	0,446
GG	25 (13,4)	162 (86,6)	1			56 (29,9)	131 (70,1)	1		
IL-1β(1)										
TT	0 (0,0)	6 (100,0)	nd	--	--	2 (33,3)	4 (66,7)	1,02	[0,18; 5,74]	0,979
CC	33 (17,2)	159 (82,8)				63 (32,8)	129 (67,2)	1		
IL-1β(2)										
CT	15 (14,4)	89 (85,6)	1,23	[0,63; 2,39]	0,538	31 (29,8)	73 (70,2)	0,87	[0,51; 1,45]	0,596
CC	33 (17,2)	159 (82,8)	1			63 (32,8)	129 (67,2)	1		

Nota: IL-6: CC (n=16), GG (n=187), GC (n=99). IL-1 β : CC (n=192), CT (104), TT (n=6)

^{*}Perfil da população total do estudo com resultado PCR-positivo para *M. hominis*

[†]Perfil da população total do estudo com resultado PCR-negativo para *M. hominis*

¥ p valor: significativo quando $\leq 0,05$

nd = Não definida

Tabela 14 – Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a detecção de *M. genitalium* por meio da PCR convencional e PCR em tempo real, em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Interleucina	<i>M. genitalium</i> PCR-Positivo	<i>M. genitalium</i> PCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ¥	<i>M. genitalium</i> qPCR-Positivo	<i>M. genitalium</i> qPCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ¥
	n (%) [*]	n (%) [†]				n (%) [*]	n (%) [†]			
IL-6(1)										
CC	1 (6,2)	15 (93,8)	0,24	[0,02; 2,49]	0,199	4 (25,0)	12 (75,0)	0,76	[0,23; 2,45]	0,646
GG	3 (1,6)	184 (98,4)	1			57 (30,5)	130 (69,5)	1		
IL-6(2)										
GC	1 (1,0)	98 (99,0)	1,59	[0,16; 15,56]	0,684	24 (24,2)	75 (75,8)	0,73	[0,41; 1,27]	0,265
GG	3 (1,6)	184 (98,4)	1			57 (30,5)	130 (69,5)	1		
IL-1β(1)										
TT	0 (0,0)	6 (100,0)	nd	--	--	3 (50,0)	3 (50,0)	2,63	[0,51; 13,40]	0,230
CC	3 (1,6)	189 (98,4)				53 (27,6)	139 (72,4)	1		
IL-1β(2)										
CT	2 (1,9)	102 (98,1)	0,81	[0,13; 4,92]	0,818	29 (27,9)	75 (72,1)	1,01	[0,59; 1,72]	0,959
CC	3 (1,6)	189 (98,4)	1			53 (27,6)	139 (72,4)	1		

Nota: IL-6: CC (n=16), GG (n=187), GC (n=99). IL-1 β : CC (n=192), CT (104), TT (n=6)

^{*}Perfil da população total do estudo com resultado positivo para *M. genitalium*

[†]Perfil da população total do estudo com resultado negativo para *M. genitalium*

¥ p valor: significativo quando $\leq 0,05$

nd = Não definida

Tabela 15 – Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a detecção de *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae* por meio da PCR convencional em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Interleucina	<i>T. vaginalis</i> PCR-positivo	<i>T. vaginalis</i> PCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ‡	<i>N.gonorrhoea</i> PCR-positivo	<i>N.gonorrhoea</i> PCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ‡
	n (%)	n (%)				n (%)	n (%)			
IL-6(1)										
CC	1 (6,2)	15 (93,8)	2,42	[0,26; 22,13]	0,418	2 (12,5)	14 (87,5)	0,54	[0,11; 2,48]	0,424
GG	5 (2,7)	182 (97,3)	1			39 (20,9)	148 (79,1)	1		
IL-6(2)										
GC	3 (3,0)	96 (97,0)	1,13	[0,26; 4,86]	0,862	24 (24,2)	75 (75,8)	1,21	[0,68; 2,16]	0,511
GG	5 (2,7)	182 (97,3)	1			39 (20,9)	148 (79,1)	1		
IL-1β(1)										
TT	0 (0,0)	6 (100,0)	nd	--	--	1 (16,7)	5 (83,3)	0,67	[0,07; 5,91]	0,719
CC	4 (2,1)	188 (97,9)				44 (22,9)	148 (77,1)	1		
IL-1β(2)										
CT	5 (4,8)	99 (95,2)	2,37	[0,62; 9,03]	0,193	20 (19,2)	84 (80,8)	0,80	[0,44; 1,44]	0,462
CC	4 (2,1)	188 (97,9)	1			44 (22,9)	148 (77,1)	1		

Nota: IL-6: CC (n=16), GG (n=187), GC (n=99). IL-1 β : CC (n=192), CT (104), TT (n=6)

*Perfil da população total do estudo com resultado positivo para *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae*

† Perfil da população total do estudo com resultado negativo para *T. vaginalis* e *N. gonorrhoeae*

‡ p valor: significativo quando $\leq 0,05$

nd = Não definida

Tabela 16 – Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a detecção de *G. vaginalis* e *C. trachomatis* por meio da PCR convencional em amostras de DNA de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Interleucina	<i>G. vaginalis</i> PCR-positivo	<i>G. vaginalis</i> PCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ¥	<i>C.trachomatis</i> PCR-positivo	<i>C.trachomatis</i> PCR-Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p ¥
	n (%) [*]	n (%) [†]				n (%) [*]	n (%) [†]			
IL-6(1)										
CC	7 (43,8)	9 (56,2)	1,21	[0,43; 3,40]	0,711	0 (0,0)	16 (100,0)	nd	--	--
GG	73 (39,0)	114 (61,0)	1			2 (1,1)	185 (98,9)			
IL-6(2)										
GC	48 (48,5)	51 (51,5)	1,47	[0,89; 2,40]	0,124	3 (3,0)	96 (97,0)	2,89	[0,47; 17,59]	0,229
GG	73 (39,0)	114 (61,0)	1			2 (1,1)	185 (98,9)	1		
IL-1β(1)										
TT	4 (66,7)	2 (33,3)	2,62	[0,47; 14,68]	0,255	1 (16,7)	5 (83,3)	19,00	[1,47; 245,64]	0,002
CC	83 (43,2)	109 (56,8)	1			2 (1,0)	190 (99,0)	1		
IL-1β(2)										
CT	41 (39,4)	63 (60,6)	0,85	[0,52; 1,38]	0,526	2 (1,9)	102 (98,1)	1,86	[0,25; 13,42]	0,531
CC	83 (43,2)	109 (56,8)	1			2 (1,0)	190 (99,0)	1		

Nota: IL-6: CC (n=16), GG (n=187), GC (n=99); IL-1 β : CC (n=192), CT (104), TT (n=6)

^{*}Perfil da população total do estudo com resultado positivo pela PCR para *G. vaginalis* e *C. trachomatis*

[†]Perfil da população total do estudo com resultado negativo pela PCR para *G. vaginalis* e *C. trachomatis*

[¥] p valor: significativo quando $\leq 0,05$

nd = Não definida

Tabela 17 – Perfil genotípico das interleucinas (IL-1 β e IL-6) e sua relação com a presença de sinais e/ou sintomas clínicos reportados ou evidenciados em mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Interleucina	Sinais e sintomas Positivo	Sinais e sintomas Negativo	Odds Ratio (bruta)	IC 95%	p [‡]
	n (%) [*]	n (%) [†]			
IL-6(1)					
CC	10 (62,5)	6 (37,5)	0,35	[0,12; 1,05]	0,053
GG	154 (82,4)	33 (17,6)	1		
IL-6(2)					
GC	72 (74,2)	25 (25,8)	0,61	[0,34; 1,11]	0,107
GG	154 (82,4)	33 (17,6)	1		
IL-1β(1)					
TT	6 (100,0)	0 (0,0)	nd	--	--
CC	150 (78,5)	41 (21,5)			
IL-1β(2)					
CT	80 (77,7)	23 (22,3)	0,95	[0,53; 1,69]	0,864
CC	150 (78,5)	41 (21,5)	1		

Nota: IL-6: CC (n=16), GG (n=187), GC (n=99); IL-1 β : CC (n=192), CT (104), TT (n=6).

^{*}Perfil da população total do estudo com sinais e sintomas

[†]Perfil da população total do estudo sem sinais e sintomas

[‡]p valor: significativo quando $\leq 0,05$

nd = Não definida

5.6 Dosagem das citocinas no soro das mulheres analisadas

5.6.1 Análise das citocinas em relação aos dados clínicos e detecção de micoplasmas

Ao serem quantificadas as citocinas IL-1 β e IL-6, no plasma sanguíneo das mulheres, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle tanto para IL-1 β ($p=0,735$) quanto para IL-6 ($p=0,735$) (Figura 16).

Figura 16 – Quantificação de IL-1 β e IL-6 (pg/mL) no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos caso e controle de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Legenda: **(a)** Concentração de IL-1 β (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres casos e controles **(b)** Concentração de IL-6 (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres casos e controles. Desvio padrão e média indicados por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística realizada por Mann Whitney. $p < 0,05$.

Os dados de detecção da qPCR para *M. hominis* foram analisados frente às dosagens das citocinas IL-1 β e IL-6. Os gráficos da Figura 17 mostram que as mulheres que foram positivas na qPCR para *M. hominis* tiveram, em média, aumento na dosagem de IL-1 β em seu sangue, ao contrário daquelas negativas na qPCR para *M. hominis*. A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa ($p=0,047$). Por outro lado, as dosagens de IL-6 nos mesmos grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,326$). As mulheres positivas na qPCR para *M. hominis* foram separadas entre aquelas que referiram algum sintoma e/ou apresentou algum sinal de infecção genital (casos) e as que não (controles). As

concentrações das citocinas encontradas nos grupos foram analisadas para ocorrência de associação estatística positiva. Contudo, a diferença entre os grupos caso e controle, tanto nas dosagens de IL-1 β ($p=0,407$) quanto de IL-6 ($p=0,332$), não foram estatisticamente significantes.

Figura 17 – Quantificação de IL-1 β e IL-6 no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos qPCR-positivo e negativo para *M. hominis*, e nos grupos caso e controle qPCR-positivo para *M. hominis* de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Legenda: **(a)** Concentração de IL-1 β (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres qPCR para *M. hominis* positivo e negativo. **(b)** Concentração de IL-6 (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres qPCR para *M. hominis* positivo e negativo. **(c)** Concentração de IL-1 β (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres qPCR para *M. hominis* casos e controles. **(d)** Concentração de IL-6 (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres qPCR para *M. hominis* casos e controles. Desvio padrão e média indicados por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística realizada por Mann Whitney. $p < 0,05$.

Os dados de detecção da qPCR para *M. genitalium* também foram analisados frente às dosagens das citocinas IL-1 β e IL-6. Os gráficos da Figura 18 mostram diferença estatisticamente significativa ($p=0,004$) entre as médias encontradas nas dosagens de IL-6 entre os grupos de mulheres com e sem *M. hominis*. O mesmo não ocorreu com a dosagem de IL-1 β . As mulheres positivas na

qPCR para *M. genitalium* foram separadas entre aquelas que referiram algum sintoma e/ou apresentou algum sinal de infecção genital (casos) e as que não (controles). As concentrações das citocinas foram analisadas para ocorrência de associação estatística positiva. Contudo, os grupos caso e controle, tanto nas dosagens de IL-1 β ($p=0,747$) quanto de IL-6 ($p=0,858$), não foram estatisticamente significantes.

Figura 18 – Quantificação de IL-1 β e IL-6 no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos qPCR-positivo e negativo para *M. genitalium*, e nos grupos caso e controle qPCR-positivo para *M. genitalium* de mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Legenda: **(a)** Concentração de IL-1 β (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres qPCR para *M. genitalium* positivo e negativo. **(b)** Concentração de IL-6 (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres qPCR para *M. genitalium* positivo e negativo. **(c)** Concentração de IL-1 β (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres qPCR para *M. genitalium* casos e controles. **(d)** Concentração de IL-6 (pg/ml) no plasma sanguíneo das mulheres qPCR para *M. genitalium* casos e controles. Desvio padrão e média indicados por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística realizada por Mann Whitney. $p < 0,05$.

5.6.2 Relação da concentração das citocinas IL-1 β e IL-6 e os diferentes perfis genômicos encontrados no estudo dos polimorfismos associados

As dosagens da citocina IL-1 β quanto para IL-6 nos diferentes grupos de mulheres e genótipos de citocinas não apresentaram diferença estatisticamente significativa. A dosagem das citocinas foi observada dentro da distribuição dos diferentes genótipos. Também foi realizada a separação em dois grupos distintos, casos e controles, avaliando assim o comportamento das dosagens dentro de cada grupo. As dosagens das citocinas IL-1 β e IL-6 nos diferentes grupos e genótipos não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si (Figura 19).

Figura 19 – Quantificação de IL-1 β e IL-6 no plasma sanguíneo, por meio do ELISA, nos grupos caso e controle e sua relação com o perfil genotípico dos polimorfismos associados às citocinas encontrados em mulheres atendidas em unidades de saúde de Vitória da Conquista – BA, 2011.

Legenda: **(a)** Concentração de IL-1 β (UFC/ μ l) no plasma sanguíneo das mulheres casos e controles de acordo com o genótipo. **(b)** Concentração de IL-6 (UFC/ μ l) no plasma sanguíneo das mulheres casos e controles de acordo com o genótipo. Desvio padrão e média indicados por linhas sólidas no gráfico. Análise estatística realizada por Mann Whitney. $p < 0,05$.

6 DISCUSSÃO

Após o início da puberdade e da atividade sexual, diversos microrganismos podem ser adquiridos no trato urogenital. Os micoplasmas fazem parte desta situação e podem ser isolados do trato genital inferior de indivíduos saudáveis e mais comumente de indivíduos com distúrbios de etiologia infecciosa (WAITES et al., 2005). Populações de diferentes hábitos, idades, região geográfica e climática, raça, sexo e outras variáveis possuem particularidades que podem interferir na incidência de doenças em geral incluindo as doenças infecciosas. A transmissão dos agentes etiológicos de ISTs fazem parte desta diversidade (SCHLICHT et al., 2004; SETHI et al., 2012; TIBALDI et al., 2009). Desta maneira, estudou-se uma população de mulheres da região do semi-árido baiano, no município de Vitória da Conquista. Vitória da Conquista é um município brasileiro do estado da Bahia. Sua população, segundo o IBGE, em 2012, era de 315.884 habitantes, o que a torna a terceira maior cidade do estado. Em relação à saúde, a Rede Municipal de Saúde se tornou, a partir de 1997, referência para todo o país. A cidade apresenta um clima tropical de altitude por causa da elevação da cidade, com média de 923 m e mais de 1.100 m nos bairros mais altos. Por este motivo, é uma das cidades mais amenas das regiões Norte e Nordeste do país, registrando temperaturas inferiores a 10 °C em alguns dias do ano. O mês mais quente é março, com temperatura média de 21,8 °C, enquanto o mês mais frio é julho, com média de 17,8 °C. A pluviosidade média anual é de 734 mm, com estação seca de maio a setembro (IBGE, 2012).

Assim, no presente estudo, estudou-se uma população de mulheres que procuraram o serviço de saúde de cinco UBSs do município citado, com e sem queixas de sintomas urogenitais sugestivos de ISTs. Os agentes infecciosos pesquisados neste estudo são importantes na causa de uretrite ou vaginites nas mulheres. Desta maneira, os resultados obtidos contribuem no delineamento da distribuição dos principais microrganismos da Classe dos Mollicutes, que são bactérias com potencial de causar infecções oportunistas. A inclusão de outros microrganismos de importância ginecológica como: neisserias, tricomonas e clamídias, contribuem no esclarecimento do papel dos micoplasmas no conjunto destas infecções urogenitais.

Mollicutes foram detectados em 76,2% (230/302) das amostras de swab vaginal. Deste total, 80,4% (185/230) das mulheres apresentavam sinais clínicos

e/ou relataram distúrbios vaginais. Uma percentagem menor foi relatada por Schlicht et al. (2004) onde evidenciaram a presença deste microrganismo em 54% (21/39) das mulheres analisadas. No presente estudo também foi observada relação estatisticamente significativa com o fato das mulheres viverem região rural, estarem em um relacionamento estável, serem sexualmente ativas e terem mais de um parceiro sexual os últimos três meses. Estes dados estão de acordo com outros achados (SCHLICHT et al., 2004; TIBALDI et al., 2009) que observaram maior prevalência de micoplasmas em mulheres com queixas ginecológicas, sexualmente ativas, com parceiros fixos ou com histórico de relações sexuais nos últimos 4 meses, sugerindo que a detecção dos micoplasmas é diretamente influenciada pelos hábitos sexuais das mulheres. Baka et al. (2009) mostraram que a disúria, dispareunia, urgência urinária e polaciúria aumentaram significativamente em pacientes com infecção por micoplasmas. Por outro lado, outros estudos apontam que esta relação pode não ocorrer ou mesmo ser mascarada pela presença de outros microrganismos (THURMAN et al., 2010; TOSH et al., 2007). Em um estudo realizado no sul do Brasil, Avelar et al. (2007) relataram que a metade (49,6%) da população estudada apresentou cultura positiva para micoplasma. Considerando que a metodologia empregada foi a cultura, os resultados poderiam indicar maior incidência se fossem utilizadas técnicas de diagnóstico molecular. De fato, Abele-Horn et al. (1996) mostraram maior sensibilidade da PCR se comparada com os resultados da cultura

Da mesma maneira que a maioria dos micoplasmas, a patogenicidade de *M. hominis* está intimamente relacionada com sua interação com o epitélio do hospedeiro. *M. hominis* pode causar resposta inflamatória em humanos e ser o principal fator envolvido na manifestação nos quadros clínicos. Adesinas de variação de fase, altamente imunogênicas, desempenham papel importante na diversidade e adaptação deste micoplasma e produtos secretados como amônia, gerados no metabolismo da arginina, podem produzir efeito citotóxico local (WAITES et al., 2009).

A frequência de *M. hominis* (15,9%), no presente estudo, encontrada pela PCR convencional foi maior do que os achados de outros países (TIBALDI et al., 2009; GUVEN et al., 2007). Maeda et al. (2004) observaram a frequência de *M. hominis* em pacientes com e sem UNG sendo de 1,3% (1/80) e de 2,6% (4/153),

respectivamente. Da mesma maneira, em um estudo no sul do Brasil, Avelar et al. (2007) também observaram uma frequência menor (4,8%). Mais recentemente, na região sudeste do país, Rodrigues et al. (2011) detectaram *M. hominis* em 21,9% das amostras de swab cervical testadas. Jombo e Enenebeaku (2008) e Doh et al. (2004) também relataram detecção similar à deste estudo sendo de 12,1% e 16,5%, respectivamente. A detecção de *M. hominis*, por meio da PCR em tempo real, encontrada neste estudo, foi quase duas vezes maior (31,8%) comparado à PCR convencional. Poucos estudos relatam a detecção de *M. hominis* por meio da qPCR. Contudo, relatos de porcentagens menores que as do presente estudo foram encontradas, variando de 2,4 a 14% (CUNNINGHAM et al., 2013; BACZYNSKA et al., 2004).

No presente estudo, verificou-se que das mulheres infectadas com *M. hominis*, 81,2% (39/48) apresentaram sinais e/ou sintomas clínicos. Do total destas mulheres, *M. hominis* foi detectado em 16,5% (39/236) na PCR convencional e em 30,9% (73/236) na qPCR. Dados similares aos da detecção por PCR convencional foi encontrado por Di Bartolomeo et al. (2002) na Argentina (16,5%). Schlicht et al. (2004) (26%), nos Estados Unidos da América, e Avelar et al. (2007) (49,5%), no Brasil, encontraram frequências maiores. Neste contexto, quando relacionados dados clínico-demográficos das mulheres com a presença de *M. hominis* detectado pela PCR convencional, houve relação estatisticamente significativa com as variáveis: primeira relação sexual antes dos 15 anos, disúria e prurido. Pelos resultados da qPCR, houve associação positiva, estatisticamente significativa, com as mulheres de idade inferior a 25 anos. Entretanto, não foi observada associação estatisticamente significativa da infecção por *M. hominis* com outros marcadores de IST incluindo atividade sexual, número de parceiros, novos parceiros sexuais, uso de preservativo, disúria, prurido ou dispareunia. Outros estudos, entretanto, relatam um forte associação de *M. hominis* com VB, sintomas urinários (ex. micção crônica inexplicável, disúria e uretrite) e com vida sexual ativa (BAKA et al., 2009; MAEDA et al., 2004; WAITES et al., 2005; ZDRODOWSKA-STEFANOW et al., 2006).

Apesar de não apresentar significância estatística, na média, houve maior carga microbiana de *M. hominis* em mulheres com sinais e/ou sintomas (casos) em relação às mulheres controles. Estes valores e variações também são frequentes na literatura (BAKA et al., 2009; MAEDA et al., 2004; WAITES et al., 2005; ZDRODOWSKA-STEFANOW et al., 2006). As metodologias e seus limites na

obtenção de resultados, os critérios na seleção de indivíduos, sintomas selecionados para cada estudo, culturas de cada região geográfica, comportamento e hábitos sexuais da população, podem ter contribuído na variação de resultados.

Após serem controladas as variáveis, na análise multivariada, os fatores associados positivamente ao risco de infecção por *M. hominis* idade da primeira relação sexual (≤ 15 anos) e a idade das mulheres (< 25 anos) apresentaram resultado similar aos relatados por Kataoka et al. (2006) e Verteramo et al. (2013). Não foi encontrada associação positiva na literatura com a escolaridade e o motivo da consulta (sintomático). Em contrapartida, na literatura, foi observada associação positiva com infecção por *C. trachomatis*, (KATAOKA et al., 2006), *G. vaginalis*, *T. vaginalis* e *U. urealyticum* (NEWTON et al., 2001), histórico de aborto induzido (VERTERAMO et al., 2013), o não uso de método contraceptivo de barreira ou o uso ocasional de preservativo (MCCORMARK et al., 1986; NEWTON et al., 2001), a mulher ser negra e ter vários parceiros sexuais na vida ou nos últimos 6 meses (MCCORMARK et al., 1986; NEWTON et al., 2001). No presente estudo, também foi observado como fator protetor, o fato das mulheres que faziam uso de contraceptivos orais tinham menor risco de infecção por *M. hominis*.

M. genitalium é reconhecido como agente etiológico da uretrite não-gonocócica em homens, e em mulheres é considerado microrganismo causador de inflamação cervical e síndromes do trato genital superior, como a doença inflamatória pélvica e infertilidade, sendo associado a ISTs (MOBLEY et al., 2012). Ao serem testadas as amostras clínicas para detecção de *M. genitalium*, foi observada positividade em 2,1% (5/230) destas na PCR convencional e em 28,1% (85/302) pela PCR em tempo real. Em estudos que relatam a detecção por meio da PCR convencional, Falk, Fredlund e Jensen (2005) e Walker et al. (2011) relataram a frequência de 2,4% e 6% respectivamente. No Brasil, Rodrigues et al. (2011), também com uso da PCR convencional, relataram a frequência de 0,9%. Da mesma maneira, Andersen et al. (2007) com uso da qPCR relataram frequência de 2,3% nas amostras de swab genital testadas. Segundo Falk, Fredlund e Jensen (2005) os valores de prevalência podem variar de 0% a 42%. A recente revisão do tema realizada por Sethi et al. (2012) mostra variação de 4 a 42% em vários estudos pelo mundo. Esta variação pode ser explicada por diversos fatores que incluem o ambiente clínico, a especificidade do ensaio empregado, critérios de seleção dos participantes (ex. sinais e sintomas específicos), localização geográfica do estudo,

comportamentos de risco (ex. profissionais do sexo) e co-infecção por outra IST. Por este motivo, a transmissão sexual e a prevalência variável de *M. genitalium* mundialmente constitui um fator de importância na saúde pública, sobretudo em locais em que não é conhecido o perfil da população afetada.

No presente estudo, dentre todas as mulheres participantes que apresentavam sinais e sintomas, 32,2% (76/236) das amostras clínicas foram positivas para *M. genitalium* quando testadas por meio da qPCR, sendo este dado estatisticamente significativo. Houve associação também significativa com o fato das mulheres viverem na região rural, terem buscado a consulta por motivo sintomático, terem se relacionado com pelo menos um parceiro nos últimos três meses e referirem prurido e corrimento vaginal. Outros estudos mencionam a associação com a idade entre 26 e 30 anos (GUPTA et al., 2009), raça (SHORT et al., 2010), doença inflamatória pélvica (DIP) (HAGGERTY; TAYLOR, 2011), corrimento vaginal (KORTE et al., 2006; WALKER et al., 2011), alto número de parceiros sexuais (ANDERSEN et al., 2007), uretrite (MOI et al., 2009) e cervicite (FALK; FREDLUND; JENSEN, 2005; JENSEN, 2004). Entretanto, como nos resultados do presente estudo, Korte et al. (2006) e Short et al. (2010) que também não associaram a infecção por *M. genitalium* com dor pélvica, sinusiorragia e dispareunia. Assim como nos achados de *M. hominis*, a carga microbiana de *M. genitalium* entre os grupos caso e controle não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,217$) apesar da média da concentração de microrganismos ter sido maior dentre as mulheres do grupo caso.

Outros pesquisadores também realizaram análise por regressão logística para excluir as variáveis de confusão. Vários fatores de risco foram analisados em cada estudo. Para a associação de risco para *M. genitalium*, observou-se associação positiva com *C. trachomatis* (HITTI et al., 2010; HUPPERT et al., 2008; KATAOKA et al., 2006), e *T. vaginalis* (HITTI et al., 2010) diferentemente do encontrado no presente estudo. Risco relacionado à idade das mulheres foi algo variável nos relatos. O presente estudo está de acordo com Huppert et al. (2008) e Kataoka et al. (2006) que também não observaram relação com a idade das mulheres. Por outro lado, outros autores reportaram associação positiva com mulheres jovens (≤ 22 anos) (MOBLEY et al., 2012) ou reportaram a associação negativa com a idade, sendo um fator protetor o fato das mulheres serem mais velhas (MANHART; CRITCHLOW; HOLMES, 2003). Ao contrário do que foi encontrado no presente

estudo, não foi observado relato de associação positiva com sinais e sintomas, sendo, pelo contrário, reportada associação negativa com o sintoma disúria (HUPPERT et al., 2008; MOBLEY et al., 2012). Além dos fatores citados, associação positiva com o contato sexual recente (HUPPERT et al., 2008), a parto prematuro (HITTI et al., 2010), ao número de parceiros sexuais nos últimos 30 dias, o hábito de fumar e fazer higiene íntima com duchas e o histórico de aborto espontâneo (MANHART; CRITCHLOW; HOLMES, 2003) foram reportados. Além disso, assim como no presente estudo, nenhuma associação foi feita com a raça/cor, a idade do primeiro intercurso sexual e escolaridade das mulheres (MANHART; CRITCHLOW; HOLMES, 2003). Huppert et al. (2008) relataram associação negativa com o uso de contracepção hormonal. Diferentemente, o presente estudo não observou associação, da mesma maneira que Manhart, Critchlow e Holmes (2003). Huppert et al. (2008) justifica seu achado com o argumento de que os hormônios provocam mudanças que iriam influenciar diretamente no microbiota vaginal, constituindo assim, um fator protetor.

M. penetrans não foi encontrado no presente estudo. Este micoplasma, desde o primeiro isolamento, foi frequentemente associado a indivíduos com HIV/AIDS (LO et al., 1991; LO et al., 1992). Por se tratar de um critério de exclusão, indivíduos portadores do vírus não participaram da amostragem do presente estudo. Apesar de ser isolado em indivíduos homossexuais HIV negativos, a maioria dos achados foi relacionada a indivíduos infectados pelo vírus do HIV (CORDOVA; BLANCHARD; CUNHA, 2000; CORDOVA; CUNHA, 2002; HUSSAIN et al., 1999).

A espécie *T. vaginalis* foi detectada em 3,0% (9/302) das amostras clínicas testadas. Dentre as amostras com este protozoário, *M. hominis* foi detectado em 66,7% (6/9) e 88,9% (8/9) pela PCR convencional e qPCR, respectivamente. Van der Schee et al. (2001) relataram frequência similar à deste estudo (88%) quando utilizada a PCR convencional. Contudo, Fang Xiao e Lun (2006) e Rappelli et al. (1998) relataram frequência de 42,8% (12/28) e 94,2% (33/35) respectivamente pelo mesmo método, demonstrando que os achados são variáveis nos diversos estudos. *M. genitalium* por sua vez, não foi detectado pela PCR convencional nas mulheres com *T. vaginalis*. Entretanto, foi detectado em 66,7% (6/9) das mesmas amostras pela qPCR. Estudo recente, feito por Shipitsyna et al. (2013), reportou frequência de 2,1% (1/47) com uso da PCR convencional. Foi observada relação estatisticamente significativa da co-infecção das espécies *M. hominis* e *M. genitalium* com *T.*

vaginalis. Estes dados estão de acordo com os diferentes achados descritos por outros autores, sugerindo forte associação nas infecções genitais com presença destes microrganismos. Interessantemente, menciona-se até mesmo uma relação de simbiose de *M. hominis* com *T. vaginalis* (BELKUM et al., 2001; DESSÌ et al., 2005; FRAGA et al., 2012; KOCH et al., 1997; SHIPITSYNA et al., 2013). Os achados de co-infecções justificam, em parte, a relação estatisticamente significativa entre a presença dos micoplasmas com a ocorrência de prurido, corrimento e disúria reportados pelas mulheres.

N. gonorrhoeae foi detectada em 21,5% (65/302) das mulheres analisadas. Estudos de Casin, Vexiau-Robert e De la Salmoniere (2002), Huppert et al. (2008) e Manhart, Critchlow e Holmes (2003) reportam frequências deste agente variando de 3,0% a 12%. Dentre as amostras positivas para *N. gonorrhoeae*, *M. hominis* e *M. genitalium* foram encontradas em concomitância ao gonococo respectivamente em 20% (13/65) e 1,5% (1/65) das amostras clínicas das testadas pela PCR convencional. Frequências de 20% (13/65) e 43,1% (28/65) foram observadas, quando utilizada a qPCR, respectivamente em *M. hominis* e *M. genitalium*. Houve associação estatisticamente significativa com a espécie *M. hominis* quando analisados os dados da qPCR, o que pode justificar a relação estatisticamente significativa encontrada com o sintoma de disúria associado à presença deste micoplasma.

No presente estudo, *C. trachomatis* foi detectada em 1,7% (5/302) das mulheres. Frequências maiores foram mencionadas por Vesić et al. (2010) em mulheres sexualmente ativas (22,75%), por Bałajewicz-Nowak, Kazimierz e Małgorzata (2011) (9,6%) e por Falk, Fredlund e Jensen (2005) (10%). No Brasil, Rodrigues et al. (2011) também observaram a prevalência de *C. trachomatis* em 6,3% das amostras de swab vaginal. No presente estudo, dentre as amostras positivas para *C. trachomatis*, a espécie *M. hominis* foi detectada em 20% (1/4) destas tanto na PCR convencional quanto na qPCR. *M. genitalium* por sua vez, não foi detectado nas amostras na PCR convencional, mas apresentou a mesma frequência (20%) que *M. hominis* pela qPCR. Estudo realizado por Falk, Fredlund e Jensen (2005) relatou co-infecção entre *M. genitalium* e *C. trachomatis* em 8,8% das amostras clínicas. Da mesma maneira, Anagrius, Lore e Jensen (2005) e Gaydos, Maldeis e Hardick (2009) reportaram frequências de 0,2% e 4,0% respectivamente. No entanto, no presente estudo, não foi observada uma associação estatisticamente

significante de co-infecção entre as espécies de micoplasma analisadas e *C. trachomatis*.

Apesar de ainda ser desconhecido o papel de *Gardnerella vaginalis* no desenvolvimento da VB, este é o principal microrganismo associado à etiologia da doença polimicrobiana, sendo um fator necessário para o estabelecimento da doença que pode ser sintomática ou não (MUZNY; SCHWEBKE, 2013). *G. vaginalis* foi detectada em 42,4% (128/302) das amostras clínicas neste estudo. A frequência elevada desta bactéria também foi observada por outros pesquisadores, como Totten et al. (1982) e Fredricks et al. (2007) que relataram frequências de 68% e 70% respectivamente. Dentre as amostras positivas para *G. vaginalis*, *M. hominis* foi detectada em 21,9% (28/128) pela PCR convencional e 40,6% (52/128) pela qPCR. A frequência de *M. genitalium*, por sua vez, foi de 8% (1/128) pela PCR convencional e 21,1% (27/128) pela qPCR nas amostras testadas. A associação positiva estatisticamente significativa com *G. vaginalis* descrita neste estudo e a participação de *M. hominis* na VB foi reportada por diversos autores (HILLIER et al., 1993; KOCH et al., 1997; TAYLOR-ROBINSON; FURR, 1997; THORSEN; JENSEN; JEUNE, 1998), sugerindo a sua participação na etiologia da VB. Contudo, o mesmo não foi observado com a espécie *M. genitalium*.

A ocorrência da co-infecção de *M. hominis* e *M. genitalium* foi estatisticamente significativa quando analisados os dados de detecção por qPCR. A frequência encontrada foi de 11,5%. Contudo, não foram encontrados relatos de co-infecção pelas duas espécies na literatura. Há a correlação de co-infecção de *M. hominis* e *Ureaplasma urealyticum* como apontado nos estudos de Faye-Kette et al. (2000), Kilic et al. (2004), Ouzounova-Raykova et al. (2011) e Stellrecht et al. (2004) que reportaram frequência de 33,3% (8/24), 3,16% (11/348), 31% (170/551) e 7% (2/84), respectivamente.

A diferença encontrada nos valores de detecção deve-se às características das populações estudadas bem como da metodologia aplicada. É consenso entre os diferentes pesquisadores (ABELE-HORN et al., 1996; AMIRMOZAFARI et al., 2009; BÉBÉAR et al., 1997) que as técnicas de biologia molecular como a PCR convencional e a qPCR são mais sensíveis do que o isolamento de microrganismos fastidiosos como micoplasmas (AMIRMOZAFARI et al., 2009; SONAWANE; TRIPATHI, 2013). Contudo, Balabanov et al. (2006) relatam que o cultivo detectou amostras que foram negativas na PCR convencional e, por este motivo,

recomendam a associação das duas técnicas como meio de minimizar os erros de diagnóstico. Apesar das metodologias de PCR detectarem o DNA alvo de microrganismos nas amostras clínicas (DOMINGUES, 2005; STELLRECHT et al., 2004), a qPCR é defendida como técnica que pode auxiliar o diagnóstico microbiológico, por mensurar a carga microbiana (JURSTRAND et al., 2005). Adicionalmente, a redução de tempo de diagnóstico de dias para horas, permite uma intervenção médica mais eficaz, incluindo as infecções mais complicadas ou pouco usuais (SVENSTRUP et al., 2005; RAGGAM et al., 2005; MOROZUMI et al., 2006). Apesar da qPCR possuir custo ainda elevado, a detecção de mais espécies microbianas por reação, indica, por outro lado, diminuição de custo além de gerar dados epidemiológicos mais precisos (EDBERG et al., 2008; JURSTRAND et al., 2005; NOMANPOUR et al., 2012; SVENSTRUP et al., 2005).

A Interleucina-1 (IL-1) é uma citocina produzida principalmente por fagócitos mononucleares ativados cuja principal função é mediar as respostas inflamatórias do hospedeiro na imunidade inata (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2011). Há duas formas de IL-1 (α e β) que se ligam ao mesmo receptor e tem efeitos biológicos idênticos, incluindo a indução das moléculas de adesão da célula endotelial e estimulação da produção de quimiocina pelas células endoteliais. (TARLOW et al., 1993; SMITH et al., 2000; ZHANG et al., 2012). Neste contexto, foi estudada mutação pontual, ou polimorfismo, no gene 2q14.2 da citocina IL-1 β na região + 3954. A troca do único par de bases (C>T) pode ocasionar aumento dos níveis de produção da citocina e estar associado a diversos quadros clínicos como periodontite crônica, (KAARTHIKEYAN et al., 2009), doença coronária (LATKOVSKIS LICIS; KALNINS, 2004), síndrome do ovário policístico (YANG et al., 2010) e vaginose bacteriana (CAUCI et al., 2007).

No presente estudo, quando analisados os genótipos encontrados para IL-1 β , aqueles associados ao polimorfismo (Heterozigoto CT e Homozigoto TT) perfizeram 36,4% (110/301), das amostras de soro testadas. Este resultado é similar ao encontrado por Cauci et al. (2007) que obtiveram 36,0%. Contudo, associação não foi estatisticamente significativa dos genótipos CT e TT com os achados de *M. hominis* e *M. genitalium*. Além disto, para as mulheres com genótipo TT, concentração ligeiramente maior do níveis de produção de IL-1 β no grupo caso, foi observado, mas sem significância estatística. Goepfert et al. (2005) observaram que as mulheres com genótipos diferente de CC apresentavam maior propensão à VB, e

o alelo T foi associado por Kaarthikeyan et al. (2009) com a maior produção de IL-1 β . Estudo recente feito em população do sudeste do Brasil por Hojo-Souza (2012) também associou o alelo T com a maior produção desta citocina. No entanto, como o volume amostral de indivíduos com genótipo TT foi pequeno e sem significância estatística associada aos demais genótipos, faz-se necessário outros estudos para confirmar a hipótese de que os indivíduos com este genótipo apresentam maior produção de IL-1 β .

McGowin et al. (2009) observaram a maior produção de IL-1 β por células do epitélio genital, mesmo quando não detectadas células viáveis de *M. genitalium*. Razin, Yogev e Naot (1998) ressaltaram que a secreção de IL-1 e outras citocinas inflamatórias provocada por *M. genitalium*, desempenha papel importante na modulação da resposta inflamatória. Entretanto, no presente estudo, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos casos e controles positivos pela qPCR para *M. hominis* e *M. genitalium* e a produção da citocina IL-1 β . Por outro lado, foi observada a maior produção de IL-1 β nas mulheres positivas pela qPCR para *M. hominis*, sendo esta diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo negativo pela qPCR. Este resultado está de acordo com Doh et al. (2004) que também observaram maior produção desta citocina em mulheres PCR-positivas para *M. hominis*. Apesar desta relação, Hedges et al. (2006) descrevem que a presença de *G. vaginalis* também foi relacionada à maior produção de IL-1 β , sendo que este dado é relevante tendo em vista a co-infecção desta espécie com *M. hominis* neste estudo. Este fato sugere portanto que o aumento nos níveis de IL-1 β pode ser provocado em associação com mais de uma das espécie encontradas no trato urogenital feminino.

Da mesma maneira que a IL-1, a Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina produzida por muitos tipos celulares, incluindo os fagócitos mononucleares, as células endoteliais e fibroblastos, que funciona na imunidade inata e adaptativa. A IL-6 estimula a síntese das proteínas da fase aguda pelos hepatócitos e estimula a diferenciação dos linfócitos B (HIRANO, 1998). O polimorfismo genético (-174 G>C) para esta citocina tem sido associado a casos de periodontite e observou-se que o genótipo GG está fortemente relacionado esta doença (SHAO et al., 2009; TERVONEN et al., 2007). Ryckman et al. (2011), no contexto das ISTs, argumentam que há poucos estudos que relacionam o polimorfismo desta citocina e seus níveis a estas infecções. Estes estudos relatam que o perfil genético GC foi mais associado

ao quadro de VB (GOEPFERT et al., 2005; GÓMEZ et al., 2010) e o genótipo CC menos relacionado à VB e menos frequente na população afro-americana (SIMHAN et al., 2003). No presente estudo, 32,8% (99/302) das mulheres apresentaram genótipo GC e as mulheres do grupo caso com este perfil genético apresentaram uma média do nível de citocinas maior do que as mulheres do mesmo grupo com genótipo CC e GG. No grupo controle, a concentração de IL-6 foi maior nas mulheres de genótipo CC, mas a diferença entre os genótipos não foi estatisticamente significativa.

Quanto à relação entre a presença de *M. hominis* e *M. genitalium* e as concentrações de IL-6, observou-se que a média das concentrações da citocina foi ligeiramente maior quando o PCR convencional foi positiva para *M. hominis*. Esta relação também foi observada por Jacobsson et al. (2005), Marconi et al. (2011) e McGowin et al. (2009). Quando esta relação foi analisada para a presença de *M. genitalium*, a média dos níveis de IL-6 foi menor quando os indivíduos foram qPCR-positivo para *M. genitalium* ($p=0,004$). Este dados discordam de estudo realizado por Wu et al. (2008) que associaram a produção da IL-6 de maneira concentração-dependente à presença de *M. genitalium*. Além disso, dentre as mulheres, qPCR-positivas para *M. genitalium*, não houve diferença significativa entre os grupos caso e controle. Esta condição pode ter ocorrido pela baixa carga de *M. genitalium* nas mulheres, ou ainda, pelo fato de as mulheres não se encontrarem em quadro agudo da infecção e sim com infecção persistente por micoplasmas. Como a IL-6 é mais produzida na fase aguda da inflamação, neste quadro clínico das mulheres, as concentrações da interleucina estariam mais baixas no plasma sanguíneo, apesar da presença desse microrganismo.

Os achados deste estudo confirmam aspectos previamente descritos como: a associação da infecção por *M. hominis* e *M. genitalium* com sintomas sugestivos de infecção do trato urogenital; o aumento da produção de IL-1 β na presença de *M. hominis* ou quando observados sinais e/ou sintomas nas mulheres. Por outro lado, para IL-6 não foi observada relação entre a presença dos micoplasmas e o aumento desta citocina. Contudo, houve aumento relacionado ao polimorfismo -174G>C. Para IL-1 β , apesar da média dos níveis serem maiores quando relacionado ao alelo T neste estudo, não houve diferença estatisticamente significativa.

Embora as limitações sejam reconhecidas, muitos aspectos positivos neste estudo foram obtidos. A amostra de mulheres é demograficamente diversificada e de

diversas regiões da cidade e a utilização de diferentes técnicas de biologia molecular para a detecção dos microrganismos e polimorfismos, bem como a confirmação destes últimos por meio de sequenciamento são fatores importantes que aumentam a confiabilidade dos dados obtidos.

Além disso, o estudo é inédito na cidade sendo relevante para começar a compreensão do perfil clínico-demográfico da população estudada. Com isto, os resultados obtidos contribuem epidemiologicamente e indicam a atenção do município diante da problemática de saúde pública evidenciada, sobretudo porque a maioria das ISTs no Brasil não são agravos de notificação compulsória. Dada a complexidade da microbiota vaginal, e seu limitado entendimento das infecções do trato genital inferior, mais estudos sobre os micoplasmas genitais são necessários para que se possa melhor entender o papel destes microrganismos como determinantes de doenças neste sítio anatômico em mulheres.

7 CONCLUSÕES

- A metodologia de qPCR apresentou maior sensibilidade e rapidez na obtenção do resultado do que a PCR convencional na detecção das espécies *M. genitalium* e *M. hominis* em amostras de swab vaginal.
- A infecção por *M. genitalium* e *M. hominis*, detectados pela qPCR, esteve associada significativamente aos sinais e sintomas clínicos observados e referidos nas mulheres participantes do estudo.
- Fatores comportamentais como: o número de parceiros sexuais, vida sexual ativa, idade de início da atividade sexual e uso de contraceptivo hormonal, estão associados aos achados de infecção por *M. genitalium* e *M. hominis* nas mulheres participantes do estudo.
- A co-infecção por *M. genitalium*, *M. hominis*, *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis* e *Trichomonas vaginalis*, estão relacionadas em parte com a sintomatologia incluída no estudo.
- O genótipo CC foi mais frequente no polimorfismo de IL-1 β (+3954C>T) do que os demais (CT e TT) na população de mulheres estudadas.
- O alelo T no polimorfismo da IL-1 β (+3954C>T) apresentou pequeno aumento nos níveis da citocina no grupo de mulheres com sinais e/ou sintomas.
- A infecção por *M. hominis* provocou aumento estatisticamente significativo da produção de IL-1 β .
- O genótipo GG foi mais detectado no polimorfismo de IL-6 (-174G>C) do que os genótipos GC e CC na população de mulheres estudada.

- O genótipo GC, presente no polimorfismo da IL-6 (-174G>C), foi associado à maior produção desta interleucina no grupo de mulheres com sinais e/ou sintomas.
- A média dos níveis de IL-6 foi menor quando os indivíduos foram qPCR-positivo para *M. genitalium*.

REFERÊNCIAS*

ABELE-HORN, M.; WOLFF, C.; DRESSEL, P.; ZIMMERMANN, A.; VAHLENSIECK, W.; PFAFF, F.; RUCKDESCHEL, G. Polymerase chain reaction versus culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 15, n. 7, p. 595-598, 1996.

AGRAWAL, A. A.; KAPLEY, A.; YELTIWAR, R. K.; PUROHIT, H. J. Assessment of single nucleotide polymorphism at IL-1A+4845 and IL-1B+3954 as genetic susceptibility test for chronic periodontitis in maharashtrian ethnicity. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 9, p. 1515-1521, 2006.

AGUIAR, Z. N.; AGUIAR, I. N. Doenças Sexualmente Transmissíveis. In: AGUIAR, M. C. S. R.; RIBEIRO, M. C. S. (Ed.). **Vigilância e controle das doenças sexualmente transmissíveis**. São Paulo: Martinari, 2009. p. 359-392.

AMIRMOZAFARI, N.; MIRNEJAD, R.; KAZEMI, B.; SARIRI, E.; BOJARI M. R.; DARKAHI, F. D. Comparison of polymerase chain reaction and culture for detection of genital mycoplasma in clinical samples from patients with genital infections. **Saudi. Med. J.**, v. 30, n. 11, p. 1401-1405, 2009.

ANDERSEN, B.; SOKOLOWSKI, I.; ØSTERGAARD, L.; KJØLSETH-MØLLER, J.; OLESEN, F.; JENSEN, J. S. Mycoplasma genitalium: prevalence and behavioural risk factors in the general population. **Sex Transm Infect.**, v. 83, n. 3, p. 237-41, 2007

ANAGRIUS, C.; LORE, B.; JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: prevalence, clinical significance, and transmission. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, p. 458-462, 2005.

ATLAS, R. M. **Microorganisms in our world**. St. Louis, Missouri: Mosby-year Book, Inc, 1995. 765 p.

AVELAR, G. S.; BERTÃO, S. A. S.; PÁDUA, R. A. F.; CARDOSO, R. F.; SIQUEIRA, V. L. D. *Mycoplasma hominis* e *Ureaplasma* sp. em amostras do trato genitourinário e sua relação com sintomas de infecção genital. **Rev. Bras. Anal. Clin.**, v. 39, n. 4, p. 295-298, 2007.

BACZYNSKA, A.; SVENSTRUP, H. F.; FEDDER, J.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Development of real-time PCR for detection of *Mycoplasma hominis*. **BMC Microbiology**, v. 4, n. 35, p. 1-13, 2004.

BAKA, S.; KOUSKOUNI, E.; ANTONOPOULOU, S.; SIOUTIS, D.; PAPAKONSTANTINO, M.; HASSIAKOS, D.; LOGOTHETIS, E.; LIAPIS, A. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in women with chronic urinary symptoms. **Urology**. v. 74, n. 1, p. 62-66, 2009.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BALABANOV, D. N.; RAKOVSKAIA, I. V.; GORINA, L. G.; GONCHAROVA, S. A.; GAMOVA, N. A.; BARKHATOVA, O. I. The comparison of mycoplasma detection methods in the urogenital tract infection. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, v. 4, p. 82-85, 2006.

BAŁAJEWICZ-NOWAK, M.; KAZIMIERZ, P.; MAŁGORZATA, M. Antioxidative system in pregnant women infected by *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*. *Ginekol. Pol.*, v. 82, n. 10, p. 732-737, 201.

BARCLAY, Laurie. **CDC Issues Annual Report on Sexually Transmitted Diseases.** Medscape, 2009. Disponível em: <<http://www.medscape.com/viewarticle/586754>>. Acesso em: 28 Feb. 2013.

BARLOW, D.; MEARS, A.; GUM, D. **Sexually Transmitted Infections: the facts.** New York: Oxford University Press, 2006. 175 p.

BASEMAN, J. B.; TULLY, J. G. Mycoplasmas: sophisticated reemerging and burdened by their notoriety. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 3, n.1, p.21-32, 1997.

BAYRAKTAR, M. R.; OZEROL, I. H.; GUCLUER, N.; CELIK, O. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *International Journal of Infectious Diseases*. v. 14, p. e90-e95, 2010.

BÉBÉAR, C.; DE BARBEYRAC B.; BÉBÉAR, C. M.; RENAUDIN, H.; ALLERY, A. New developments in diagnostic and treatment of mycoplasma infections in humans. *Wien. Klin. Wochenschr.*, v. 109, n. 14-15, p. 594-9, 1997.

BELKUM, A. V.; VAN DER SCHEE, C.; VAN DER MEIJDEN, W. I.; VERBRUGH, H. A.; SLUITERS, H. J. F. A clinical study on the association of *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* infections in women attending a sexually transmitted disease (STD) outpatient clinic. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 32, p. 27-32, 2001.

BERGEY'S. **Manual of determinative bacteriology.** Michigan: Michigan State University, 2001. Disponível em: <<http://www.cme.msu.edu/bergeys>>. Acesso em: 14 Mar. 2005.

BLANCHARD, A.; MONTAGNIER, L. AIDS-Associated Mycoplasmas. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 48, p. 687-712, 1994.

BOVÉ, J. M. The one-hundredth anniversary of the first culture of a mollicute, the contagious bovine peripneumonia microbe, by Nocard and Roux, with the collaboration of Borrel, Salimbeni, and Dujardin-Baumetz. *Res. Microbiol.*, v. 150, p. 239-245, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS. **Cultura, isolamento e identificação da *Neisseria gonorrhoeae***. Brasília, 1997. 72 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Secretaria de Educação Básica. **Adolescentes e jovens para a educação entre pares: prevenção das DST, HIV e Aids**. Brasília, 2011. 61 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Prevalências e frequências relativas de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) em populações selecionadas de seis capitais brasileiras**. Brasília, 2008. 224 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. **Manual de Controle das Doenças Sexualmente Transmissíveis**. 4. ed. Brasília, 2005. 140 p.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 813 p.

BUSSOLO, F., BARATTO, T., BERTOLONI, G., GROSSATO, A. Survival of genital mycoplasma on various bacteriological swabs and transport media. **Boll. Ist. Sieroter. Milan**, v. 60, n. 1, p. 31-40, 1981.

CASIN, I.; VEXIAU-ROBERT, D.; DE LA SALMONIERE, P. et al. High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in the lower genitourinary tract of women attending a sexually transmitted disease clinic in Paris, France. **Sex. Transm. Dis.**, v. 29, n. 6, p. 353–359, 2002.

CAUCI, S.; SANTOLO, M.; CASABELLATA, G.; RYCKMAN, K.; WILLIAMS, S. M.; GUASCHINO, S. Association of interleukin-1b and interleukin-1 receptor antagonist polymorphisms with bacterial vaginosis in non-pregnant Italian women. **Mol. Hum. Reproduc.**, v. 13, n. 4, p. 243–250, 2007.

CHANDIOK, S.; BROOMAN, P. J. C.; CHOUDHURY, S. D.; COSTELLO, B.; BLACKLOCK, N. J. *Chlamydia trachomatis* infection in the genitorurinary tract in a 'marital' relationship. In: MORISSET, R.; HURSTAK, E. **Advances in Sexually Transmitted Diseases**. Utrech, Netherlands: VNU Science Press, 1986. p. 17-20.

CHERNOV, V. M.; CHERNOVA, O. A.; BARANOVA, N. B.; GORSHKOV, O. V.; MEDVEDEVA, E. S.; SHAĬMARDANOVA, G. F. The adaptation of mycoplasmas to stress conditions: features of proteome shift in *Mycoplasma hominis* PG37 under starvation and low temperature. **Mol Biol (Mosk)**, v. 45, n. 5, p. 914-23, 2011.

COHEN, C. R.; MANHART, L. E.; BUKUSI, E. A. Association between *Mycoplasma genitalium* and acute endometritis. **Lancet**, v. 359, p. 765–766, 2002.

COHEN, C. R.; MUGO, N. R.; ASTETE, S. G. Detection of *Mycoplasma genitalium* in women with laparoscopically diagnosed acute salpingitis. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, p. 463–466, 2005.

CORDOVA, C. M., CUNHA, R. A. Detecção de *Mycoplasma genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans* em pacientes com sintomas de uretrite e em indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil. **J. Bras. Pat. Med. Lab.**, v. 38, n. 2, p. 111-118, 2002.

CORDOVA, C. M.; BLANCHARD, A.; CUNHA, R. A. Higher prevalence of urogenital mycoplasmas in human immunodeficiency virus-positive patients as compared to patients with other sexually transmitted diseases. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 14, p. 246–253, 2000.

CUNHA, R. A. F., TAKEI, K.; VAZ, A. J.; ROSENTHAL, C. Detection of mycoplasmas in urethral swabs from HIV-1 infected patients and control individuals using culture techniques and polymerase chain reaction. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 1-5. 1998.

CUNNINGHAM, S. A.; MANDREKAR, J. N.; ROSENBLATT, J. E.; PATEL, R. Rapid PCR Detection of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum*. **International Journal of Bacteriology**. v. 2013, p. 1-7, 2013.

DAXBOECK, F.; IRO, E.; TAMUSSINO, K.; KRAUSE, R.; ASSADIAN, O.; WENISCH, C. Bacteremia with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Patients Undergoing Hysterectomy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, p. 608–611, 2003.

DELOST, M. D. **Introduction to diagnostic microbiology: a text and workbook**. USA: Mosby-Year Book, Inc. 1997. 552 p.

DESSI, D.; DELOGU, G.; EMONTE, E.; CATANIA, M. R.; FIORI, P. L.; RAPPELLI, P. Longterm survival and intracellular replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* cells: potential role of the protozoon in transmitting bacterial infection. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 1180–1186, 2005.

DETRICK, B.; NAGINENI, C. N.; HOOKS, J. J. Cytokines: regulators of immune response and key therapeutic targets. In: O'GORMAN, M. R. G.; DONNENBERG, A. D. **Handbook of Human immunology**. New York, CRC PRESS, 2008. p. 495-516.

DÍAZ-GARCÍA, F. J.; HERRERA-MENDOZA, A. P.; GIONO-CEREZO, S.; GUERRA-INFANTE, F. M. *Mycoplasma hominis* attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 21, n. 6, p. 1591-1598, 2006.

DI BARTOLOMEO, S.; FERMEPIN, M. R.; SAUKA, D. H.; TORRES, R. A. Prevalence of associated microorganisms in genital discharge, Argentina. **Rev Saúde Pública**. v. 36, n. 5, p. 545-52, 2002.

DIENES, L.; EDSALL, G. Observation of the L-organism of Klieneberger. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 36, p. 740-744, 1937.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, n. 6, p. 2095-2147, 1996.

DOH, K.; BARTON, P. T.; KORNEEVA, I.; PERNI, S. C.; BONGIOVANNI, A. M.; TUTTLE, S. L.; SKUPSKI, D. W.; WITKIN, S. S. Differential vaginal expression of interleukin-1 system cytokines in the presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v. 12, p. 79-85, 2004.

DOMINGUES, D. Micoplasmas: que papel nas infecções humanas? **Acta Med. Port.**, Lisboa, v. 18, p. 377-384, 2005.

DYBVIG, K.; VOELKER, L. L. Molecular biology of mycoplasmas. **Annu Rev Microbiol.**, v. 50, p. 25-57, 1996.

EDBERG, A.; JURSTRAND, M.; JOHANSSON, E.; WIKANDER, E.; HÖÖG, A.; AHLQVIST, T.; FALK, L.; JENSEN, J. S.; FREDLUND, H. A comparative study of three different PCR assays for detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens from men and women. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 304-309, 2008.

EDWARD, D. G. F. F.; FREUNDT, E. A. **J. Gen. Microbial.**, v. 14, p. 197-207, 1956.

EDWARDS, R. K.; FERGUSON, R. J.; DUFF, P. The interleukin-1 beta +3953 single nucleotide polymorphism: cervical protein concentration and preterm delivery risk. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 55, p. 259-264, 2006.

ENGEL, S. A.; ERICHSEN, H. C.; SAVITZ, D. A.; THORP, J.; CHANOCK, S. J.; OLSHAN, A. F. Risk of spontaneous preterm birth is associated with common proinflammatory cytokine polymorphisms. **Epidemiology**, v. 16, p. 469-477, 2005.

ERICKSON, B. Z.; ROSS, R. F.; BOVE, J. M. Isolation of *Mycoplasma salivarium* from swine. **Vet. Microbiol.**, v. 16, n. 4, p. 385-390, 1988.

FALK, L.; FREDLUND, H.; JENSEN, J. S. Signs and symptoms of urethritis and cervicitis among women with or without *Mycoplasma genitalium* or *Chlamydia trachomatis* infection. **Sex. Transm. Infect.**, v. 81, p. 73-78, 2005.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. **Avian Diseases**, v. 39, p. 729-735, 1995.

FANG, S. L.; XIAO, J. C.; LUN, Z. R. Detection of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* by PCR. **Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi**, v. 24, n. 2, p. 144-145, 2006.

FAYE-KETTÉ, H.; LA RUCHE, G.; ALI-NAPO, L.; MESSOU, N.; VIHO, I.; WELFFENS-EKRA, C.; DOSSO, M.; MSELLATI, P. Genital mycoplasmas among pregnant women in Côte d'Ivoire, West Africa: prevalence and risk factors. **Int J STD AIDS**, v. 11, n. 9, p. 599-602, 2000.

FÉRANDON, C.; PEUCHANT, O.; JANIS, C.; BENARD, A.; RENAUDIN, H. PEREYRE, S.; BÉBÉAR, C. Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. **Journal Compilation European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI**, v. 17, p. 155–159, 2011.

FRAGA, J.; RODRÍGUEZ, N.; FERNÁNDEZ, C.; MONDEJA, B.; SARIEGO, I.; FERNÁNDEZ-CALIENES, A.; ROJAS, L. *Mycoplasma hominis* in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates: association with parasite genetic polymorphism. **Exp. Parasitol.**, v. 131, n. 3, p. 393-398, 2012.

FRASER, C. M.; GOCAYNE, J. D.; WHITE, O.; ADAMS, M. D.; CLAYTON, R. A.; FLEISCHMANN, R. D.; BULT, C. J.; KERLAVAGE, A. R.; SUTTON, G.; KELLEY, J. M.; FRITCHMAN, R. D.; WEIDMAN, J. F.; SMALL, K. V.; SANDUSKY, M.; FUHRMANN, J.; NGUYEN, D.; UTTERBACK, T. R.; SAUDEK, D. M.; PHILLIPS, C. A.; MERRICK, J. M.; TOMB, J. F.; DOUGHERTY, B. A.; BOTT, K. F.; HU, P. C.; LUCIER, T. S.; PETERSON, S. N.; SMITH, H. O.; HUTCHISON, C. A.; VENTER, J. C. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, n. 20, p. 397-403, 1995.

FREDRICKS, D. N.; FIEDLER, T. L.; THOMAS, K. K.; OAKLEY, B. B.; MARRAZZO, J. M.; Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3270–3276, 2007.

GABRIDGE, M. G.; CHANDLER, D. K. F.; DANIELS, M. J. Pathogenicity factors in *Mycoplasmas* and *Spiroplasmas*. In: RAZIN, S.; BARILE, M. F. **The mycoplasmas IV: mycoplasma pathogenesis**. Londres: Academic Press, INC, 1985. v. 1. p. 313-351.

GAYDOS, C.; MALDEIS, N. E.; HARDICK, A. et al. *Mycoplasma genitalium* as a contributor to the multiple etiologies of cervicitis in women attending sexually transmitted disease clinics. **Sex. Transm. Dis.**, v. 36, p. 598–606, 2009.

GENC, M. R.; GERBER, S.; NESIN, M.; WITKIN, S. S. Polymorphism in the interleukin-1 gene complex and spontaneous preterm delivery. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 187, p. 157-163, 2002.

GLASS, J. I.; ASSAD-GARCIA, N.; ALPEROVICH, N.; YOOSEPH, S.; LEWIS, M. R.; MARUF, M.; HUTCHISON, C. A.; SMITH, H. O. J.; VENTER, C.; Essential genes of a minimal bacterium. **PNAS**, v. 103, n. 2, p. 425-430, 2006.

GOEPFERT, A. R.; VARNER, M.; WARD, K.; MACPHERSON, C.; KLEBANOFF, M.; GOLDENBERG, R. L.; MERCER, B.; MEIS, P.; IAMS, J.; MOAWAD, A.; CAREY, J. C.; LEVENO, K.; WAPNER, R.; CARITIS, S. N.; MODOVNIK, M.; SOROKIN, Y.; O'SULLIVAN, M. J.; VAN DORSTEN, J. P.; LANGER, O. Differences in inflammatory

cytokine and Toll-like receptor genes and bacterial vaginosis in pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 193, n. 4, p. 1478-85, 2005.

GÓMEZ, L. M.; SAMMEL, M. D.; APPLEBY, D. H.; ELOVITZ, M. A.; BALDWIN, D. A.; JEFFCOAT, M. K.; MACONES, G. A.; PARRY, S. Evidence of a gene-environment interaction that predisposes to spontaneous preterm birth: a role for asymptomatic bacterial vaginosis and DNA variants in genes that control the inflammatory response. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 202, n. 4, p. 386.e1-6, 2010.

GOULET, M.; DULAR, R.; TULLY, J. G.; BILLOWES, G.; KASATIYA, S. Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 2823-5, 1995.

GRAU, O.; TUPPIN, P.; SLIZEWICZ, B.; LAUNAY, V.; GOJJARD, C.; BAHRAOUI, E.; DELFRAISSY, J. F.; MONTAGNIER, L. A. longitudinal study of seroreactivity against *Mycoplasma penetrans* in HIV-infected homosexual men: association with disease progression. **Aids Res. Hum. Retroviruses**, v. 14, n. 8, p. 661-667, 1998.

GUPTA, A.; GUPTA, A.; GUPTA, S.; MITTAL, A.; CHANDRA, P.; GILL, A. K. Correlation of mycoplasma with unexplained infertility. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 280, p. 981-985, 2009.

GUVEN, M. A.; DILEK, U.; PATA, O.; DILEK, S.; CIRAGIL, P. Prevalance of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections in the unexplained infertile women. **Arch. Gynecol. Obstet.**, v. 276, p. 219-223, 2007.

HAGGERTY, C. L.; TAYLOR, B. D. *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of pelvic inflammatory disease. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

HAIER, J.; NASRALLA, M.; FRANCO, A. R.; NICOLSON, G. L. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 38, p. 504-509, 1999.

HEDGES, S.; BARRIENTES, F.; DESMOND, R. A.; SCHWEBKE, J. R. Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. **J. Infect. Dis.**, v. 193, p. 556-562, 2006.

HILLIER, S. L.; KROHN, M. A.; RABE, L. K.; KLEBANOFF, S. J.; ESCHENBACH, D. A. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant women. **Clin. Infect. Dis.**, v. 16, n. S4-S2, p. 73-81, 1993.

HIRANO, T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. **Int. Rev. Immunol.**, v. 16, n. 3-4, p. 249-284, 1998.

HITTI, J.; GARCIA, P.; TOTTEN, P.; PAUL, K.; ASTETE, S.; HOLMES, K. K. Correlates of cervical *Mycoplasma genitalium* and risk of preterm birth among Peruvian women. **Sex Transm Dis.**, v. 37, n. 2, p. 81-5, 2010.

HOJO-SOUZA, Natália Satchiko. **Estudo da ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único em genes codificadores de membros da família das citocinas IL-1 e IL-17 e suas associações com a cardiomiopatia chagásica humana.** 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2012.

HORNOK, S.; HAJTÓS, I.; MELI, M. L.; FARKAS, I.; GÖNCZI, E.; MEILI, T.; HOFMANN-LEHMANN, R. First molecular identification of *Mycoplasma ovis* and 'candidatus M. haemoovis' from goat, with lack of haemoplasma pcr-positivity in lice. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 3, n.60, p. 355–360, 2012.

HUPPERT, J. S, MORTENSEN, J. E., REED, J. L. et al. *Mycoplasma genitalium* detected by transcription-mediated amplification is associated with *Chlamydia trachomatis* in adolescent women. **Sex. Transm. Dis.**, v. 35, n. 3, p. 250–254, 2008.

HUSSAIN, A. I.; ROBSON, W. L.; KELLEY, R.; REID, T.; GANGEMI, J. D. Mycoplasma penetrans and other mycoplasmas in urine of human immunodeficiency virus-positive children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, n. 5, p. 1518-23, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo Brasileiro 2012.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

ISO, T.; SUZUKI, J.; SASAOKA, F.; SASHIDA, H.; WATANABE, Y.; FUJIHARA M.; NAGAI, K.; HARASAWA, R. Hemotropic mycoplasma infection in wild black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). **Vet. Microbiol.**, Morioka, Japan, v. 1-2, n.163, p. 184-189, 2013.

JACOBSSON, B.; MATTSBY-BALTZER, I.; HAGBERG, H. Interleukin-6 and interleukin-8 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the chorioamniotic membranes. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 112, p. 719–724, 2005,

JEFFCOAT, M. K.; MACONES, G. A. Evidence of a gene-environment interaction that predisposes to spontaneous preterm birth: a role for asymptomatic bacterial vaginosis and DNA variants in genes that control the inflammatory response. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, p.1-6, 2010.

JENSEN, J. S.; ULDUM, S. A.; SØNDERGÅRD-ANDERSEN, J.; VUUST, J.; LIND, K. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 1, p. 46-50, 1991.

JENSEN, J. S.; BORRE, M. B.; DOHN, B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 261–266, 2003.

JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. **JEADV**, v. 18, p. 1–11, 2004.

JEREMIAS, J.; GIRALDO, P.; DURRANT, S.; RIBEIRO-FILHO, A.; WITKIN, S. S. Relationship between *Ureaplasma urealyticum* Vaginal Colonization and Polymorphism in the Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 912–914, 1999.

JOMBO, G. T.; ENENEBEAKU, M. N. Genital mycoplasma infections among women in an urban community of northern Nigeria: do we need to search for them? **Niger. J. Med.**, v. 17, n. 3, p. 310-6, 2008.

JÚNIOR, M. F. Q. S.; SIQUEIRA, L. F. G. Tricomoníase. In: CINERMAN, B.; CINERMAN, S. (Ed.). **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. 2ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. p. 34-38.

JURKOVIC, D. A.; HUGHES, M. R.; BALISH, M. F. Analysis of energy sources for *Mycoplasma penetrans* gliding motility. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 338, p. 39–45, 2013.

JURSTRAND, M.; JENSEN, J. S.; FREDLUND, H.; FALK, L.; MÖLLING, P. Detection of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens by real-time PCR and by conventional PCR assay. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 23–29, 2005.

KAARTHIKEYAN, G.; JAYAKUMAR, N. D.; PADMALATHA, O.; SHEEJA, V.; SANKARI, M.; ANANDAN, B. Analysis of the association between interleukin-1beta (+3954) gene polymorphism and chronic periodontitis in a sample of the south Indian population. **Indian. J. Dent. Res.**, v. 20, n. 1, p. 37-40, 2009.

KARLEN, Y.; MCNAIR, A.; PERSEGUERS, S.; MAZZA, C.; MERMOD, N. Statistical significance of quantitative PCR. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 131, p. 1-16, 2007.

KATAOKA, S.; YAMADA, T.; CHOU, K.; NISHIDA, R.; MORIKAWA, M.; MINAMI, M.; YAMADA, H.; SAKURAGI, N.; MINAKAMI, H. Association between preterm birth and vaginal colonization by mycoplasmas in early pregnancy. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 1, p. 51-5, 2006.

KILIC, D.; BASAR, M. M.; KAYGUSUZ, S.; YILMAZ, E.; BASAR, H.; BATISLAM E. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 57, n. 1, p. 17-20, 2004.

KOCH, A.; BILINA, A.; TEODOROWICZ, L. E.; STARY, A. *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in patients with sexually transmitted diseases. **Wien Klin. Wochenschr**, v. 109, p. 584-549, 1997.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JR, V. R. D.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. São Paulo: Panamericana, 1989. 730 p.

KOTANI, H.; BUTLER, G. H.; TALLARIDA, D.; CODY, C.; McGARRITY, G. J. Microbiological cultivation of *Mycoplasma hyorhinis* from cell cultures. **In Vitro Cell. Dev. Biol.**, v. 26, p. 91-96, 1990.

KORTE, J. E.; BASEMAN, J. B.; CAGLE, M. P.; HERRERA, C.; PIPER, J. M.; HOLDEN, A. E.; PERDUE, S. T.; CHAMPION, J. D.; SHAIN, R. N. Cervicitis and genitourinary symptoms in women culture positive for *Mycoplasma genitalium*. **J Reprod. Immunol.**, v. 55, n. 4, p. 265-75, 2006.

KRAUSE, D. C.; TAYLOR-ROBINSON, D. Mycoplasmas which infect humans. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis**. Washington (DC): American Society for Microbiology, 1992. p. 417-444.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune. **International Reviews of Immunology**, v. 30, p. 16–34, 2011.

LATKOVSKIS, G.; LICIS, N.; KALNINS, U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. **European Journal of Immunogenetics**, v. 31, p. 207-213, 2004.

LEACH, R. H. The osmotic requirements for growth of mycoplasmas. **J. Gen. Microbiol.**, v. 27, p. 345-354, 1962.

LEVINSON, Warren. **Microbiologia médica e imunologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 663 p.

LO, S. C.; HAYES, M. M.; WANG, R. Y.; PIERCE, P. F.; KOTANI, H.; SHIH, J. W. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. **Lancet**. v. 338, p. 1415-8, 1991.

LO, S-C.; LANGE, M.; WANG, R.; KLEIN, E. B.; INADA, Y. et al. Development of Kaposi's sarcoma is associated with serologic evidence of *Mycoplasma penetrans* infection: retrospective analysis of a prospective cohort study of homosexual men. **Natl. Conf. on Human Retroviruses and Related Infections**. Washington, DC, 1993.

LO, S-C.; HAYES, M. M.; TULLY, J. G.; WANG, R. Y-H.; KOTAN, H.; PIERCE, P. F. ROSE, D. D. L.; SHIH, J. W-K. *Mycoplasma penetrans* sp. nov. from the Urogenital Tract of Patients with AIDS. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, n. 3, p. 357-364, 1992.

LO, S-C. Mycoplasmas and AIDS. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. **Mycoplasmas molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 525-545.

LO, S-C.; HAYES, M. M.; WANG, Y-H.; RICHARD; PIERCE, P. F.; KOTANI, H.; SHIH, J. W-K. Newly discovered mycoplasma isolated from patients infected with HIV. **The Lancet**, v. 338, p.1415-1418, 2001.

LOPES, M. H. B. de M. Doenças Sexualmente Transmissíveis. In:_____. **Enfermagem na saúde da mulher**. Goiânia: AB, 2006. p. 229-259.

LORD, P. C.; WILMOTH L. M. Expression of interleukin-1 alpha and beta genes by human blood polymorphonuclear leukocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 87, n. 4, p. 1312-1321, 1991.

MAEDA, S-I.; DEGUCHI, T.; ISHIKO, H.; MATSUMOTO, T.; NAITO, S.; KUMON, H.; TSUKAMOTO, T.; ONODERA, S.; KAMIDONO, S.; Detection of *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in patients with non-gonococcal urethritis using polymerase chain reaction-microtiter plate hybridization. **International Journal of Urology**, v. 11, p. 750–754, 2004.

MAGGI, R. G.; MASCARELLI, P. E.; BALAKRISHNAN N.; ROHDE, C. M.; KELLY, C. M.; RAMAIAH, L.; LEACH, M. W.; BREITSCHWERDT, E. B. 'Candidatus *Mycoplasma haemomacacae*' and *Bartonella quintana* bacteremia in cynomolgus monkeys. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, DC, v. 51, n. 3, 2013.

MARCONI, C.; DE ANDRADE RAMOS, B. R.; PERAÇOLI, J. C.; DONDEERS, G. G.; DA SILVA, M. G. Amniotic fluid interleukin-1 beta and interleukin-6, but not interleukin-8 correlate with microbial invasion of the amniotic cavity in preterm labor. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 65, n. 6, p. 549-56, 201.

MAHONY, J. B.; LUINSTRA, K. E.; TYNDALL, M.; SELLORS, J. W.; KREPEL, J.; CHERNESKY, M. Multiplex PCR for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genitourinary Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 3049–3053, 1995.

MALLA, N.; GOYAL, K. Sexually Transmitted Infections: an overview, sexually transmitted infections. In: MALLA, N. (Ed.). **Sexually Transmitted Infections**. Croácia: InTech, 2012. p. 3-28.

MANHART, L. E.; CRITCHLOW, C. W.; HOLMES, K. K. et al. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. **J. Infect. Dis.**, v. 187, p. 650–657, 2003.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Métodos diagnósticos. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

MCCORMACK, W. M.; ROSNER, B.; ALPERT, S.; EVRARD, J. R.; CROCKETT, V. A.; ZINNER, S. H. Vaginal colonization with *mycoplasma hominis* and *ureaplasma urealyticum*. **Sex Transm Dis.**, v. 13, n. 2, p. 67-70, 1986.

MCGARRITY, G. J.; KOTANI, H.; BUTLER, G. H. Mycoplasmas and tissue culture cells. **Mycoplasmas molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 445-454.

MCGOWIN, C. L.; POPOV, V. L.; PYLES, R. B. Intracellular *Mycoplasma genitalium* infection of human vaginal and cervical epithelial cells elicits distinct patterns of

inflammatory cytokine secretion and provides a possible survival niche against macrophage-mediated killing. **BMC Microbiol.**, v. 14, n. 9, p. 139. 2009.

MEAGER, T. **The molecular biology of cytokine**. England: MMS, 1998. 416 p.

MEHEUS, A.; SCHRYVER, A. de. Sexually transmitted diseases in the Third World. In: HARRIS, J. R. M.; FOSTER, S. M. (Ed.). **Sexually Transmitted Diseases and AIDS**. United Kingdom: Churchill Livingstone, 1991. p. 201-217.

MENON, R.; MERIALDI, M.; BETRAN, A. P.; DOLAN, S.; JIANG, L.; FORTUNATO, S. J. et al. Analysis of association between maternal tumor necrosis factor- α promoter polymorphism (-308), tumor necrosis factor concentration, and preterm birth. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 195, p. 1240-1248, 2006.

MGONE, C. S.; LUPIWA, T.; YEKA, W. High prevalence of *Neisseria gonorrhoeae* and multiple sexually transmitted diseases among rural women in the eastern Highlands Province of Papua New Guinea, detected by polymerase chain reaction. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 29, n. 1, p. 775-779, 2002.

MIETTINEN, A. *Mycoplasma hominis* in patients with pelvic inflammatory disease. **Isr. J. Med. Sci.**, v. 23, p. 713-716, 1987.

MILES, R. J. Cell Nutrition and Growth. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 23-40.

MILES, R. J.; NICHOLAS, R. A. J. **Methods in molecular biology Mycoplasma protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. 336p.

MOBLEY, V. L.; HOBBS, M. M.; LAU, K.; WEINBAUM, B. S.; GETMAN, D. K.; SEÑA, A. C. Mycoplasma genitalium infection in women attending a sexually transmitted infection clinic: diagnostic specimen type, coinfections, and predictors. **Sex Transm Dis.**, v. 39, n. 9, p. 706-9, 2012.

MOI, H.; REINTON, N.; MOGHADDAM, A. Mycoplasma genitalium in women with lower genital tract inflammation. **Sex Transm Infect.**, v. 85, n. 1, p. 10-4, 2009.

MOREIRA, P. R.; LIMA, P. M. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 148, n. 1, p. 119-126, 2007.

MOROZUMI, M.; NAKAYAMA, E.; IWATA, S.; YASUKO.; AOKI.; HASEGAWA, K.; KOBAYASHI, R.; CHIBA, N.; TAJIMA, T.; UBUKATA, K. Simultaneous Detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 1440-1446, 2006.

MUHLRADT, A.; PELEG, I.; ROBERTSON, J. A.; ROBINSON, I. M.; KAHANE, I. Acetate kinase activity in mycoplasmas. **J. Bacteriol.**, v. 147, p. 271-273, 1981.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 908 p.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1072p.

MUZNY, C. A.; SCHWEBKE, J. R. *Gardnerella vaginalis*: Still a Prime Suspect in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 15, n. 2, p. 130-135, 2013.

NARCHI, N. Z.; JANICAS, R. C. S. V.; FERNANDES, R. A. Q. Prevenção e controle do câncer cérvico-uterino. In: FERNANDES, R. A. Q.; NARCHI, N. Z. (Ed.). **Enfermagem e saúde da mulher**. Barueri, SP: Manole, 2007. 325 p.

NEIMARK, H. C. Origins and evolution of wall-less prokaryotes. In: MADOFF, S. (Ed.). **The bacterial L- forms**. New York: Marcel Dekker, 1986. p. 21-42.

NETO, R. L. **Estudo da frequência de micoplasma no trato urogenital, orofarínge e conjuntiva de macaco (*Cebus*)**. 2007. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

NEWTON, E. R.; PIPER, J. M.; SHAIN, R. N.; PERDUE, S. T.; PEAIRS, W. Predictors of the vaginal microflora. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 184, n. 5, p. 845-53, 2001.

NOCARD, E.; ROUX E. Le microbe de la pleuropneumonie. **Ann. Inst. Pasteur Paris**, v. 12, p. 240-262, 1898.

NOMANPOUR, B.; GHODOUSI, A.; BABAEI, T.; JAFARI, S.; FEIZABADI M. M. Single tube real time PCR for detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*, from clinical samples of cap. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 59, n. 2, p. 171–184, 2012.

OLSEN, B.; LAN, P. T.; LUNDBORG, C. S.; KHANG, T. H.; UNEMO, M. Population-based assessment of *Mycoplasma genitalium* in Vietnam – low prevalence among married women of reproductive age in a rural area. **Journal European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, p. 533–537, 2009.

OUZOUNOVA-RAYKOVA, V. V.; MARKOVSKA, R.; MIZGOVA, G.; MITOV, I. G. Detection of the sexually transmissible genital mycoplasmas by polymerase chain reaction in women. **Sex. Health**, v. 8, n. 3, p. 445-6. 2011.

PALMER, H. M.; GILROY, C. B.; FURR, P. M.; TAYLOR-ROBINSON, D. Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 61, p. 199-203. 1991.

PATEL, M. A.; NYIRJESY, P. Role of mycoplasma and ureaplasma species in female lower genital tract infections. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 12, n. 6, p. 417-422, 2010.

PEDRAZA-AVILES, A. G.; ORTIZ-ZARAGOZA, M. C. Symptomatic bacteriuria due to ureaplasma and mycoplasma in adults. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 40, p. 9-13, 1998.

PEREYRE, S.; SIRAND-PUGNET, P.; BEVEN, L.; CHARRON, A.; RENAUDIN, H.; BARRÉ, A.; AVENAUD, P.; JACOB, D.; COULOUX, A.; BARBE, V.; DARUVAR, A.; BLANCHARD, A.; BÉBÉAR, C. Life on Arginine for *Mycoplasma hominis*: Clues from Its Minimal Genome and Comparison with Other Human Urogenital Mycoplasmas. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 10, p. 1-13, 2009.

PITCHER, D. G.; WINDSOR, D.; WINDSOR, H.; BRADBURY, J. M.; YAVARI, C.; JENSEN, J. S.; LING, C.; WEBSTER, D. *Mycoplasma amphoriforme* sp. nov., isolated from a patient with chronic bronchopneumonia. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 2589-94, 2005.

PERRY, J. J.; STALEY, J. T. Gram-positive Eubacteria. In:_____. **Microbiology dynamics and diversity**. Orlando, Florida: Saunders College Publishing, 1997. p. 479-510.

PHILLIPI, M. L. S.; ARONE, E. M. **Enfermagem em Doenças sexualmente transmissíveis**. 12. ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2010. 125 p.

POGGIO, T. V.; ORLANDO, N.; GALANTERNIK, L. E GRINSTEIN, S. Microbiology of acute arthropathies among children in Argentina: *Mycoplasma pneumoniae* and *hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 17, p. 304-308, 1998.

RAGGAM, R. B.; LEITNER, E.; BERG, J.; MÜHLBAUER, G.; MARTH, E.; KESSLER, H. H. Single-run, parallel detection of DNA from three Pneumonia-producing bacteria by real-time polymerase chain reaction. **J. Mol. Diagn.**, v. 7, n. 1, p. 133–138, 2005.

RAPPELLI, P.; ADDIS, M. F.; CARTA, F.; FIORI, P. L. *Mycoplasma hominis* parasitism of *Trichomonas vaginalis*. **Lancet**, v. 352, p. 1286, 1998.

RAZIN, S.; MASOVER, G. K.; PALANT, M.; HAYFLICK, L. Morphology of *Ureaplasma urealyticum* (T-mycoplasma) organisms and colonies. **J Bacteriol.**, v. 130, n. 1, p. 464-71, 1977.

RAZIN, S. Molecular properties of Mollicutes: a synopsis. In: RAZIN, S. TULLY, J. G. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego, California: Academic Press, INC, 1995. v. 1, p. 1-25.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 4, p. 1094-156, 1998.

RAZIN, S. *Mycoplasma* taxonomy and ecology. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 3-22.

RAZIN, S.; Introduction Comments. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Methods in Mycoplasmaology**. New York, New York: Academic Press, INC. 1983a. v. 1. p. 3-7.

RAZIN, S. Identification of mycoplasma colonies. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Methods in mycoplasmaology**. New York: Academic Press, INC, 1983b. v. 1. p. 83-88.

RAZIN, S.; TULLY, J. G. Mycoplasma characterization. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasmaology**. New York: Academic Press, 1983c. p. 150-176.

RILEY, D. E.; ROBERTS, M. C.; TAKAYAMA, T.; KRIEGER, J. N. Development of a Polymerase Chain Reaction-Based Diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 465-472, 1992.

RODRIGUES, M. M.; FERNANDES, P. Á.; HADDAD, J. P.; PAIVA, M. C.; SOUZA, M. DO C.; ANDRADE, T. C.; FERNANDES, A. P. Frequency of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* species in cervical samples. **J. Obstet. Gynaecol.**, v. 31, n. 3, p. 237-41. 2011.

RODWELL, A. W. Introductory Remarks. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Methods in Mycoplasmaology**. New York: Academic Press, INC, 1983. v. 1, p. 93-97.

ROSENGARTEN, R.; CITTI, C.; GLEW, M.; LISCHESKI, A.; DROESSE, M.; MUCH, P.; WINNER, F.; BRANK, M.; SPERGSE, J. Host-pathogen interactions in mycoplasma pathogenesis: virulence and survival strategies of minimalist prokaryotes. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 290, n. 1, p. 15-25, 2000.

RUST, S.; FUNKE, H.; ASSMANN, G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 16, p. 3623-3629, 1993.

RYCKMAN, K. K.; WILLIAMS, S. M.; KALINKA, J. Correlations of selected vaginal cytokine levels with pregnancy-related traits in women with bacterial vaginosis and mycoplasmas. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 78 p. 172-180, 2008.

SCHEE, C.; SLUITERS, H. J. F.; MEIJDEN, W. I.; BEEK, P.; PEERBOOMS, P.; VERBRUGH, H., BELKUM, A. Host and pathogen interaction during vaginal infection by *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urealyticum*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 45, p.61-67, 2001.

SCHLICHT, M. J.; LOVRICH, S. D.; SARTIN, J. S.; KARPINSKY, P.; CALLISTER, S. M.; AGGER, W. A. High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 10, p. 4636-40, 2004.

SCHOTTE, H.; SCHLUTER, B.; RUST, S.; ASSMAN, G.; DOMSCHKE, W.; GAUBITZ, M. Interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) in Caucasian german patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, v. 40. p. 393-400, 2001.

SETHI, S.; GAGANDEEP, S.; SAMANTA, P.; SHARMA, M. *Mycoplasma genitalium*: An emerging sexually transmitted pathogen. **Indian J. Med. Res.**, v. 136, n. 6, p.942-955, 2012.

SHAO, M. Y.; HUANG, P.; CHENG, R.; HU, T. Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **J. Zhejiang Univ. Sci.**, v. 10, n. 12, p. 920-7, 2009.

SHIPITSYNA, E.; KRASNOSELSKIKH, T.; ZOLOTOVERKHAYA, E.; SAVICHEVA, A.; KROTIN, P.; DOMEIKA, M.; UNEMO, M. Sexual behaviours, knowledge and attitudes regarding safe sex, and prevalence of non-viral sexually transmitted infections among attendees of youth clinics in St. Petersburg, Russia. **JEADV**, v. 27, p. e75–e84, 2013.

SHORT, V. L.; TOTTEN, P. A.; NESS, R. B.; ASTETE, S. G.; KELSEY, S. F.; MURRAY, P.; HAGGERTY, C. L. The demographic, sexual health and behavioural correlates of *Mycoplasma genitalium* infection among women with clinically suspected pelvic inflammatory disease. **Sex. Transm. Infect.**, v. 86, n. 1, p. 29-31. 2010.

SIMHAN, H. N.; KROHN, M. A.; ROBERTS, J. M.; ZEEVI, A.; CARITIS, S. N. Interleukin-6 promoter-174 polymorphism and spontaneous preterm birth. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 189, n. 4, p. 915-918, 2003.

SMITH, A. J. P.; HUMPHRIES, S. E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 20, p. 43–59, 2009.

SMITH, D. E.; RENSHAW, B. R.; KETCHUM, R. R.; KUBIN, M.; GARKA, K. E. SIMS, J. E. Four New Members Expand the Interleukin-1 Superfamily. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 2, p. 1169–1175, 2000.

SONAWANE, G. G.; TRIPATHI, B. N. Comparison of a quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) with conventional PCR, bacterial culture and ELISA for detection of subsp. infection in sheep showing pathology of Johne's disease. **Springerplus**, v. 2, n. 45, p. 1-9, 2013.

SOPER, D. E. Infecções Geniturinárias e Doenças Sexualmente Transmitidas. In: BEREK, J. S. (Ed.). **Berek e Novak**: tratado de ginecologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 404-415.

STELLRECHT, K. A.; WORON, A. M.; MISHRIK, N. G.; VENEZIA, R. A. Comparison of Multiplex PCR Assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasmas. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 1528–1533, 2004.

SVENSTRUP, H. F.; JENSEN, J. S.; BJÖRNELIUS, E.; LIDBRINK, P.; BIRKELUND, S.; CHRISTIANSEN, G. Development of a quantitative real-time PCR assay for detection of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3121–3128, 2005.

TARLOW. J. K.; BLAKEMORE, A. I.; LENNARD, A.; SOLARI, R.; HUGHES, H. N, et al. Polymorphism in human IL-1 receptor antagonist gene intron 2 is caused by variable numbers of an 86-bp tandem repeat. **Hum. Genet.**, v. 91, p. 403–404, 1993.

TAYLOR-ROBINSON, D. Mycoplasmal and mixed infections of the human male urogenital tract and their possible complications. In: RAZIN, S.; BARILE, M. F. (Ed.). **The mycoplasmas IV: mycoplasma pathogenecity**. Londres: Academic Press, INC. 1985. v. 1, p.27-63.

TAYLOR-ROBINSON, D.; DAVIES, H. A.; SARATHCHANDRA, P.; FURR P. M. Intracellular location of micoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 72, p. 705-714, 1991.

TAYLOR-ROBINSON, D.; FURR, P. M. Genital mycoplasma infections. **Wien Klin Wochenschr**, v. 109, p. 578-583, 1997.

TERVONEN, T.; RAUNIO, T. Polymorphisms in the CD14 and IL-6 genes associated with periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 5, p. 377-383, 2007.

THOMAS. G. B.; SBARRA, A. J.; FEINGOLD, M.; SELVARAJ, R. J.; CETRULO, C. L. *Chlamydia trachomatis* in pregnancy. In: MORISSET, R. HURSTAK, E. **Advances in Sexually Transmitted Diseases**. Utrech, Netherlands: VNU Science Press, 1986. p. 3-9.

THORSEN, P.; JENSEN, I. P.; JEUNE, B. et al. Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 178, p. 580-587, 1998.

THURMAN, A. R.; MUSATOVVOVA, O.; PERDUE, S.; SHAIN, R. N.; BASEMAN, J. G.; BASEMAN, J. B. *Mycoplasma genitalium* symptoms, concordance and treatment in high-risk sexual dyads. **Int J STD AIDS**. v. 21, n. 3, p. 177-83. 2010.

TIBALDI, C.; CAPPELLO, N.; LATINO, M. A.; MASUELLI, G.; MARINI, S.; BENEDETTO, Vaginal and endocervical microorganisms in symptomatic and asymptomatic non-pregnant females: risk factors and rates of occurrence. **C. Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, n. 7, p. 670-9, 2009.

TOSH, A. K.; VAN DER POL, B.; FORTENBERRY, J. D.; WILLIAMS, J. A.; KATZ, B. P.; BATTEIGER, B. E.; ORR, D. P. *Mycoplasma genitalium* among adolescent women and their partners. **J. Adolesc. Health**. v. 40, n. 5, p. 412-7, 2007.

TOTTEN, P. A.; AMSEL, R.; HALE, J.; PIOT, P.; HOLMES, K. K. Selective differential human blood bilayer media for isolation of *Gardnerella* (Haemophilus) *vaginalis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 15, p. 141-147, 1982.

TREVILATTO, P. C.; SCAREL-CAMINAGA, R. M. Polymorphism at position -174 of IL-6 gene is associated with susceptibility to chronic periodontitis in a Caucasian Brazilian population. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, n. 5, p. 438-442, 2003.

TROLLOPE-KUMAR, K.; GUYATT, G. Syndromic approach for treatment of STIs: time for a change. **The Lancet**, v. 367, n. 9520, p. 1380-1381, 2006.

TRYON, V. V.; BASEMAN, J. B. Pathogenic Determinants and Mechanisms. In: MANILOFF, J.; MCELHANEY, R. N.; FINCH, L. R.; BASEMAN, J. B. (Ed.). **Mycoplasmas, molecular biology and pathogenesis**. Washington: American Society For Microbiology, 1992. p. 457-471.

TULLY, J. G.; TAYLOR-ROBINSON, D.; COLE, R. M.; ROSE, D. L. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **Lancet**. v. 13, n. 1, p. 1288-91, 1981.

TULLY, J. G. Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of Mollicutes. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. (Ed.). **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego, California: Academic Press, 1995. v. 1, p. 33-39.

TULLY, J. G. Introductory remarks. In: RAZIN, S.; TULLY, J. G. **Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology**. San Diego, California: Academic Press, INC. 1995. v. 1, p. 29-31.

TULLY, J. G. Newly Discovered Mollicutes. In: RAZIN, S.; BARILE, M. F. **The Mycoplasmas IV: Mycoplasma Pathogenecity**. Londres: Academic Press, INC, 1985. v. 1, p. 1-26.

UNO, M.; DEGUCHI, T.; KOMEDA, H.; HAYASAKI, M.; IIDA, M.; NAGATANI, M. *Mycoplasma genitalium* in cérvices of Japanese women. **Sex. Transm. Dis.**, v. 24, p. 284-286, 1997.

VAN DER SCHEE, C.; SLUITERS, J.F.; VAN DER MEIJDEN, W. I.; VAN BEEK, P.; PEERBOOMS, P.; VERBRUGH, H. A.; VAN BELKUM, A. Host and pathogen interaction during vaginal infection by *Trichomonas vaginalis* and *Mycoplasma hominis* or *Ureaplasma urelyticum*. **Journal of Microbiology Methods**, v. 45, p. 61-67, 2001.

VAN KUPPEVELD, F. J. M.; VAN DER LOGT, J. T. M.; ANGULO, A. F.; VAN ZOEST, M. J.; QUINT, W. G. V.; NIESTERS, J. M.; GALAMA, J. M. D.; MELCHERS, W. J. G. Genus and Species-Specific Identification of Mycoplasmas by 16S rRNA Amplification. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 2606-2615, 1992.

VESIĆ S.; VUKIĆEVIĆ, J.; GVOZDENOVIC, E.; SKILJEVIĆ, D.; JANOSEVIĆ, S.; MEDENICA. L. *Chlamydia trachomatis* and urogenital mycoplasmas in nonconococcal urethritis in men. **Medicinski Pregled**, v. 63, n.1-2. p. 47-50, 2010.

VERTERAMO, R.; PATELLA, A.; CALZOLARI, E.; RECINE, N.; MARCONE, V.; OSBORN, J.; CHIARINI, F.; DEGENER, A. M. An epidemiological survey of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in gynaecological outpatients, Rome, Italy. **Epidemiol. Infect.**, v. 28, p. 1-8, 2013.

VOLOKHOV, D. V.; NORRIS, T.; RIOS, C.; DAVIDSON, M. K.; MESSICK, J. B.; GULLAND, F. M.; CHIZHIKOV, V. E. Novel hemotrophic mycoplasma identified in naturally infected California sea lions (*Zalophus californianus*). **Vet. Microbiol.**, Rockville, v. 1-2. n. 149, p. 262-268, 2011

WAITES, K. B.; TULLY, J. G.; ROSE, D. L.; MARRIOTT, P. A.; DAVIS, R. O.; CASSELL, G. H. **Current Microbiology**, v. 15, p. 325-327, 1987.

WAITES, K. New developments in human disease due to mycoplasma. In: BLACHARD, A.; BROWNING, G. **Mycoplasmas, molecular biology and strategies for control**. U.K: Horizon Bioscience, 2005. p. 289-354.

WAITES, K. B.; SCHELONKA, R. L.; XIAO, L.; GRIGSBY, P. L.; NOVY, M. J. Congenital and opportunistic infections: *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis*. **Semin Fetal Neonatal Med.**, v. 14, n. 4, p. 190-9, 2009.

WALKER, J.; FAIRLEY, C. K.; BRADSHAW, C. S.; TABRIZI, S. N.; CHEN, M. Y.; TWIN, J.; TAYLOR, N.; DONOVAN, B.; KALDOR, J. K.; MCNAMEE, K.; URBAN, E.; WALKER, S.; CURRIE, M.; BIRDEN, H.; BOWDEN, F.; GUNN, J.; PIROTTA, M.; GURRIN, L.; HARINDRA, V.; GARLAND, S.; HOCKING, J. S. The difference in determinants of *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* in a sample of young Australian women. **MC Infect. Dis.**, v. 1, n. 11, p. 35, 2011.

WANG, R. Y.; SHIH, J. W.; WEISS, S. H.; GRANDINETTI, T.; PIERCE, P. F.; LANGE M.; ALTER, H. J.; WEAR, D. J.; DAVIES, C. L.; MAYUR, R. K. et al. *Mycoplasma penetrans* infection in male homosexuals with AIDS: high seroprevalence and association with Kaposi's sarcoma. **Clin. Infect. Dis.**, v. 17, n. 4, p.724-729, 1993.

WEINSTEIN, S. A.; STILES, B. G. A review of the epidemiology diagnosis and evidence-based management of *Mycoplasma genitalium*. **Sexual Health**, v. 8, p. 143-158, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Departament of reproductive health and research. **Emergence of multi-drug resistant *Neisseria gonorrhoeae*: threat of global rise in untreatable sexually transmitted infections. Fact sheet.** 2011. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>> Acesso em: 10 Mar. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Strategy for the Prevention and Control of Sexually Transmitted Infections: 2006-2015: Breaking the Chain of Transmission** (Geneva: WHO). 2007. Disponível em: <http://www.who.int/reproductive-health/publications/stisstrategy/stis_strategy.pdf>. Acesso em: 10 Mar. 2013.

WOLTERS, K. C.; KORNELISSE, R. F.; PLATENKAMP, G. J.; SCHUURMAN-VAN DER LEM, M. I.; VAN DER SCHEE, C.; HARTWIG, N. G. E.; VERDUIN, C. M. A case of *Mycoplasma hominis* meningo-encephalitis in a full-term infant: rapid recovery after start of treatment with ciprofloxacin. **Eur. J. Pediatr.**, v. 162, p. 514-516, 2003.

WU, Y.; QIU, H.; ZENG, Y.; YOU, X.; DENG, Z.; YU, M.; ZHU, C. Mycoplasma genitalium lipoproteins induce human monocytic cell expression of proinflammatory cytokines and apoptosis by activating nuclear factor kappaB. **Mediators Inflamm.**, v. 2008, p. 1-8, 2008.

YANG, Y.; QIAO, J.; TANG, R. X.; LI, M. Z. Genotype and haplotype determination of interleukin (IL) 1 beta (g. -511C>T and g. +3954C>T) and IL-1RN in polycystic ovary syndrome. **Fertil. Steril.**, v. 94, n. 1, p. 384-6, 2010.

ZARFFARD, M. R.; SAIFUDDIN, M.; SHA, B. E.; SPEAR, G. T. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n. 34, p. 277-281, 2002.

ZDRODOWSKA-STEFANOW, B.; KŁOSOWSKA, W. M.; OSTASZEWSKA-PUCHALSKA, I.; BUŁHAK-KOZIOŁ, V.; KOTOWICZ, B. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. **Adv. Med. Sci.**, v. 51, p. 250-3, 2006.

APÊNDICE A – Questionário

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
MESTRADO EM MICROBIOLOGIA

FICHA DE ATENDIMENTO GINECOLÓGICO

NUMERO:	DATA:	
UNIDADE DE SAÚDE:		
NOME (Apenas Iniciais):	IDADE (Anos):	ESCOLARIDADE
REGIÃO: 1. ☐ RURAL 2. ☐ URBANA	ANO DO ÚLTIMO EXAME	
RAÇA/COR: 1. ☐ BRANCA 2. ☐ PRETA 3. ☐ AMARELA 4. ☐ PARDA 5. ☐ INDÍGENA		
MOTIVO DA CONSULTA:		

HISTÓRIA MENSTRUAL

MENARCA	ANOS	DATA DA ÚLTIMA MENSTRUÇÃO
---------	------	---------------------------

HISTÓRIA SEXUAL

IDADE DO 1º INTERCURSO SEXUAL	VIDA SEXUAL ATUAL 1. ☐ ATIVA 2. ☐ NATIVA	RELAÇÃO ESTÁVEL 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
LIBIDO 1. ☐ MANTIDA 2. ☐ PRESENTE 3. ☐ DIMINUÍDA 4. ☐ AUSENTE	ORGASMO 1. ☐ FREQUENTE 2. ☐ RARO 3. ☐ NUNCA	
NÚMERO DE PARCEIROS NA VIDA 1. ☐ UM 2. ☐ 2 A 5 3. ☐ 6 A 9 4. ☐ 10 OU MAIS	NÚMERO DE PARCEIROS (ÚLT. 3 MESES) 1. ☐ UM 2. ☐ DOIS 3. ☐ TRÊS 4. ☐ QUATRO OU MAIS	
DISPAREUNIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	SINUSIORRAGIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	PRESERVATIVO 1. ☐ SEMPRE 2. ☐ ÀS VEZES 3. ☐ RARAMENTE 4. ☐ NÃO NUNCA
MÉTODO ANTICONCEPCIONAL	TEMPO DE USO DE ANTICONCEPCIONAL	COMO USA? (SOLICITAR DESCRIÇÃO DO USO) 1. ☐ CORRETAMENTE 2. ☐ INCORRETAMENTE

HISTÓRICO OBSTÉTRICO

NÚMERO DE GESTAÇÕES	ABORTAMENTOS		
	ESPONTÂNEOS		PROVOCADOS
	PARTOS		
	PREMATUROS	A TERMO NATURAIS	A TERMO ARTIFICIAIS

ANTECEDENTES PATOLÓGICOS

DST 1. ☐ PRÉVIA E TRATADA 2. ☐ DESCONHECE OU NEGA 3. ☐ PRÉVIA E NÃO TRATADA	HIV 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE
--	---

SINTOMATOLOGIA

1. CORRIMENTO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	2. DISÚRIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	3. ODOR 1. ☐ FÉTIDO 2. ☐ CARACTERÍSTICO
4. DOR PÉLVICA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	5. PRURIDO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	6. HIPEREMIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
7. VERRUGA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	8. BOLHA/VESÍCULA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	9. FERIDA/ÚLCERA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE
10. PETÊQUIAS 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	OUTRO	

1. PARCEIRO/SINTOMATOLOGIA		1.1 QUEIXA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
1.2 HIPEREMIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	1.3 CORRIMENTO ANORMAL 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	1.4 VERRUGA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE
1.5 BOLHA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	1.6 DISÚRIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	1.7 PRURIDO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE
1.8 DISPAREUNIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO 3. ☐ NÃO SABE	OUTRO	

TRATAMENTO

PARA MENOPAUSA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	ESTROGENIZADA PARA PAPANICOLAU 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
---	---

HISTÓRIA DE TRATAMENTO ANTERIOR

COMPRIMIDO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	CREME VAGINAL 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	TEMPO 1. ☐ 1 SEMANA 2. ☐ 2 SEMANAS 3. ☐ MAIS DE 2 SEMANAS
INJEÇÃO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	PARCEIRO TRATADO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	RELAÇÃO SEXUAL NO TRATAMENTO 1. ☐ SIM COM CONDON 2. ☐ SIM SEM CONDON 3. ☐ NÃO
2. PARCEIRO/TRATAMENTO		2.1 SABE INFORMAR 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO
2.2 PARCEIRO TRATADO 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO	2.3 TIPO DO TRATAMENTO 1. ☐ COMP. 2. ☐ POMADA 3. ☐ INJEÇÃO	2.4 TRATAMENTO CONCOMITANTE C/ PARCERIA 1. ☐ SIM 2. ☐ NÃO

EXAME GINECOLÓGICO

ACHADOS EM GENITALIA EXTERNA

1. ☐ VESÍCULA
2. ☐ VERRUGA
3. ☐ ÚLCERA
4. ☐ BOLHA
5. ☐ PETÉQUIAS
6. ☐ ODOR
7. OUTRO (Descrever)

ACHADOS EM GENITALIA INTERNA

1. ☐ MUCOPUS ENDOCERVICAL
2. ☐ CORRIMENTO VAGINAL
3. ☐ COLO FRIÁVEL
4. ☐ MASSA ANORMAL DE TECIDO NO COLO
5. OUTROS (Descrever):

CONDUTA

____/____/____
DATA

ASSINATURA E CARIMBO