

Mestrado em Biologia Molecular em Saúde

Casuística da infeção por *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*/ *Ureaplasma parvum* e *Mycoplasma hominis* em amostras genitourinárias de utentes de um Laboratório de Análises Clínicas

Trabalho submetido por

Tânia Vanessa Bernardo Gonçalves

para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular

Trabalho orientado por

Doutora Ana Paula Ferreira

Dr. Carlos Cardoso

Março 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e avós, pela sua paciência e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Doutora Ana Paula Ferreira pela orientação contínua do longo percurso de construção da tese, pela celeridade e prontidão na resposta a todas as minhas dúvidas, pela insistência no rigor e pela motivação.

Ao Dr. Carlos Cardoso pela disponibilidade para orientação e por me permitir a oportunidade de realizar este estudo numa área que me apaixona e para a qual pretendo continuar a contribuir: Análises Clínicas.

Aos meus pais e avós, pelo carinho e compreensão, e pelas “injeções” de otimismo e motivação.

Ao Sérgio pelo apoio, companheirismo e amor.

Aos meus amigos pelo ombro sempre pronto para o desabafo e pela amizade desinteressada.

RESUMO

Neste estudo foram analisados os dados referentes às bactérias *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, numa amostra constituída por 16 020 utentes de um laboratório de análises clínicas.

Constatou-se que o maior número de pedidos de análises recaía sobre a *Chlamydia trachomatis*, dado esta ser uma das doenças sexualmente transmissíveis com maior prevalência atualmente, e que a faixa etária com maior pedido de análises se situa entre os 27 e os 34 anos, correspondendo a adultos sexualmente ativos e em idade reprodutiva. De salientar também a elevada incidência de infertilidade em Portugal e a ligação entre este facto e as doenças sexualmente transmissíveis.

Verificou-se que do total das análises requeridas apenas 4,6% foram amostras do género masculino. No entanto, são os homens que apresentam globalmente uma maior taxa de positivos, estando este facto associado à existência de sintomatologia aquando do diagnóstico.

Da análise da amostra em estudo conclui-se que as colheitas de urina e exsudado uretral são os produtos que apresentam maior positividade para ambos os sexos, no entanto, a colheita com maior número de pedidos é a de exsudado vaginal.

Foi possível ainda verificar que os métodos moleculares que permitem a distinção entre *ureaplasmas* contribuem para o uso racional de antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE: *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasmas*, DST/Infertilidade

ABSTRACT

In this study data regarding bacteria *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*, a sample consisting of 16 020 users in a clinical laboratory were analyzed.

It was found that the largest number of requests for analyzes fell on *Chlamydia trachomatis*, as this is one of the sexually transmitted diseases most prevalent today, and that the age group with the largest order of analysis is between 27 and 34 years, corresponding to sexually active adults of reproductive age. Also worth mentioning is the high incidence of infertility in Portugal and the connection between this fact and sexually transmitted diseases.

It was found that the total number of analyzes required only 4,6 % of the samples were males. However, they are generally men have a higher positivity rate, this fact being linked to the existence of symptoms at the time of diagnosis.

Sample analysis in study concluded that the taking of urine and urethral exudate are products that have higher rates of both sexes, however, the harvest with more applications is the vaginal exudate.

It was also possible to verify that molecular methods which allow the distinction between ureaplasmas contributes to the rational use of antibiotics.

KEYWORDS: *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Ureaplasmas*, STD/Infertility

ÍNDICE GERAL

Dedicatória	1
Agradecimentos	2
Resumo.....	3
Abstract	4
Índice de Figuras.....	7
Índice de Tabelas	8
Lista de Siglas.....	9
1. Introdução.....	10
1.1 Chlamydia	12
1.1.1 Morfologia e Fisiologia	13
1.1.2 Patogénese e Imunidade	16
1.1.3 Manifestações Clínicas.....	18
1.1.4 Diagnóstico Laboratorial.....	21
1.1.5 Tratamento e Prevenção	25
1.2 Mycoplasma e Ureaplasma	26
1.2.1 Patogenicidade.....	27
1.2.2 Mecanismos de infeção	29
1.2.3 Suscetibilidade aos Antibióticos.....	30
1.2.4 Diagnóstico Laboratorial.....	31
1.2.5 Tratamento e Prevenção	32
2. Materiais e Métodos	33
2.1 Técnica usada para a deteção de Chlamydia trachomatis	33
2.2 Técnica usada para a deteção de Mycoplasma hominis	35
2.3 Técnica usada para a deteção de Ureaplasma urealyticum/ Ureaplasma parvum	35
3. Resultados e Análise	37
3.1 Análise Exploratória e Descritiva	37
3.1.1 Caracterização da população em estudo.....	37

3.1.2	Avaliação do número de análises realizadas	38
3.1.3	Chlamydia trachomatis.....	39
3.1.4	Mycoplasma hominis	41
3.1.5	Ureaplasma urealyticum.....	42
3.1.6	Ureaplasma parvum	44
3.2	Avaliação do Pedido de Análises em Função da faixa etária.....	45
3.3	Presença Simultânea das Diversas Bactérias	48
3.4	Avaliação da Necessidade de Aplicação de Terapêutica	48
4.	Discussão.....	50
5.	Conclusões.....	54
6.	Bibliografia.....	55
7.	Anexos.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de crescimento da <i>Chlamydia</i>	14
Figura 2 - Microfotografia eletrônica de um fino corte de inclusão de <i>Chlamydia</i>	15
Figura 3 - Evolução da infecção (uretrite) não tratada.....	20
Figura 4 - Histograma de frequências da variável idade.....	37
Figura 5 – Distribuição dos pedidos de análises.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Pedidos de análise distribuídos em função do género.....	39
Tabela 2 – Pedidos de análise para <i>Chlamydia trachomatis</i>	40
Tabela 3 – Análises para <i>Chlamydia trachomatis</i> em função do género.....	40
Tabela 4 – Pedidos de análise para <i>Mycoplasma hominis</i>	41
Tabela 5 – Análises para <i>Mycoplasma hominis</i> em função do género.....	42
Tabela 6 – Pedidos de análise para <i>Ureaplasma urealyticum</i>	43
Tabela 7 – Análises para <i>Ureaplasma urealyticum</i> em função do género.....	43
Tabela 8 – Pedidos de análise para <i>Ureaplasma parvum</i>	44
Tabela 9 – Análises para <i>Ureaplasma parvum</i> em função do género.....	44
Tabela 10 – Análises requisitadas em função da faixa etária.....	45
Tabela 11 - Percentagem de resultados positivos e negativos obtidos para cada análise requisitada em função da faixa etária	46
Tabela 12 – Cruzamento de CT com as restantes bactérias	48
Tabela 13 – <i>Ureaplasma parvum</i> vs <i>Ureaplasma urealyticum</i>	49
Tabela 14 – Resultados de <i>Chlamydia trachomatis</i> em função da faixa etária.....	67
Tabela 15 – Resultados de <i>Ureaplasma urealyticum</i> em função da faixa etária.....	67
Tabela 16 – Resultados de <i>Ureaplasma parvum</i> relativos à Faixa Etária.....	68
Tabela 17 – Resultados de <i>Mycoplasma hominis</i> relativos à Faixa Etária.....	68

LISTA DE SIGLAS

CT - *Chlamydia trachomatis*

UU - *Ureaplasma urealyticum*

UP - *Ureaplasma parvum*

MH - *Mycoplasma hominis*

DIP - Doença Inflamatória Pélvica

EB – Elementary Body (Corpo Elementar)

RB – Reticulate Body (Corpo Reticular)

LGV - Linfo Granuloma Venéreo

DST - Doença Sexualmente Transmissível

NAAT - Testes de Amplificação de Ácidos Nucleicos

PCR - Polymerase Chain Reaction

LCR - Ligase Chain Reaction

TMA - Transcription-Mediated Amplification Assay

IST - Infecção Sexualmente Transmissível

UNG - Uretrite Não Gonocócica

NG – *Neisseria gonorrhoeae*

URI – 1º jato Urina

URT – Exsudado Uretral

VAG – Exsudado Vaginal

CEE – Exsudado Endocolo/Endocervical

RET – Exsudado Retal

ESP – Esperma

VUL – Exsudado Vulvar

1. INTRODUÇÃO

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) mostram que as doenças sexualmente transmissíveis são a segunda doença que mais afeta as mulheres entre os 15 e os 44 anos nos países em desenvolvimento e estão referenciados cerca de 50 milhões de novos casos por ano no mundo para a infecção por *Chlamydia trachomatis* (CT).

A relação entre a infecção genital subclínica e o comprometimento da fertilidade feminina tem recebido enfoque científico desde que foi estabelecida uma linha causal entre sequelas irreversíveis de infecções genitais e infertilidade.¹ As infecções genitais diagnosticadas em mulheres inférteis resultam de agentes inoculados sexualmente ou de microrganismos originalmente comensais que adquirem patogenicidade. O maior foco de interesse incide sobre um dos principais agentes de Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST), a bactéria *Chlamydia trachomatis*, que tem efeitos comprovados na fertilidade em ambos os sexos^{2,3} e cuja infecção tem sido reconhecida como um dos maiores problemas de saúde pública pois é considerada como uma das Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) mais frequentes em todo o mundo. Na maioria das mulheres, 70 a 75%, e em mais de 50% dos homens essas infecções cursam de forma assintomática. Assim, a CT pode ser considerada bem adaptada ao ser humano, uma vez que consegue multiplicar-se sem causar respostas exacerbadas do organismo, criando assim dificuldades na obtenção do diagnóstico. Esta particularidade retarda ou inviabiliza totalmente o tratamento, permitindo que os casos de infecção genital se propaguem ao trato genital superior. Na ausência de tratamentos, 10 a 40% dos casos evoluem para uma doença inflamatória pélvica (DIP)⁴, documentada como a principal causa de infertilidade por fator tubário⁵ e a mais importante causa de infertilidade que pode efetivamente ser prevenida.² Acresce ainda o problema das reinfeções que são muito frequentes se os parceiros sexuais não forem tratados.

A homeostasia do ambiente vaginal depende da sua flora comensal que é dominada por espécies *Lactobacillus* spp.^{6,7} designados também Bacilos Döderlein.⁷ O papel protetor destes bastonetes gram-positivos resulta do contributo para a manutenção do ambiente ácido (pH entre 4 e 4.5) da vagina saudável⁸ e para a integridade do muco cervical.⁹ O pH ácido vaginal resultante cria um ambiente restritivo e correlaciona-se

com menor risco de infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasmas genitais*.⁸ A diminuição da concentração ou da função das bactérias acidófilas diminui a acidificação do microambiente alterando o estado de equilíbrio dinâmico. Espécies patogênicas e oportunistas têm assim maior probabilidade de sobrevivência neste microambiente, com implicações diretas na suscetibilidade a doenças infecciosas genitais.

O papel do *Mycoplasma hominis* (MH) e do *Ureaplasma urealyticum* (UU) tem ganho relevo e vários estudos demonstraram percentagens significativas de MH (6%) e UU (20 a 30%) em culturas cervicais de mulheres inférteis.¹⁰⁻¹² Estas espécies são comensais do trato genital humano mas podem contribuir para a infertilidade feminina no cenário de uma vaginose bacteriana ou por ascensão ao trato genital superior estéril, ao potenciar alterações tubárias e cervicais que impedem o trajeto espermático e a fecundação.¹³ O *Ureaplasma urealyticum*, dividido mais recentemente em *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* (UP), é um microrganismo que pode colonizar o trato genital feminino até cerca de 67% das mulheres sexualmente ativas na idade reprodutiva. Há evidências de que o tempo, a duração e a intensidade da resposta inflamatória à infecção por *Ureaplasma* sejam os principais determinantes dos resultados gestacionais e neonatais.

No entanto, não está ainda esclarecido se o tratamento destas infecções tem impacto na fertilidade.¹⁴ Contudo, o seu rastreio e tratamento são importantes dada a potencial interferência na eficácia de técnicas invasivas de diagnóstico de infertilidade e de procriação medicamente assistida, por contaminação dos meios de cultura, impedindo a fertilização in útero, nidação, e o desenvolvimento embrionário (induzindo aborto espontâneo), e ainda pelo risco de DIP por inoculação de microrganismos na cavidade uterina no momento da transferência embrionária.¹⁵

Foi realizado um estudo da prevalência de organismos não-virais em 1 718 pacientes de uma clínica de medicina geniturinária de Inglaterra, em que a prevalência de *Chlamydia trachomatis* foi de 7,1%, *Ureaplasma urealyticum* de 16,1% e *Ureaplasma parvum* de 35,6%.¹⁶ Um outro estudo foi realizado para avaliar a prevalência de *Ureaplasma urealyticum*, sendo esta de 14,66%, e de *Mycoplasma hominis*, que se situa nos 3,16%.¹⁷ Utilizando técnicas de deteção por PCR, foram apresentados resultados semelhantes num estudo onde se identificou *Ureaplasma*

urealyticum em 17,2% das mulheres, enquanto o *Mycoplasma hominis* estava presente apenas em 2,1% das mulheres.¹⁸ Outro estudo aplicando o método de PCR para o diagnóstico verificou uma prevalência de CT em 8 %, UU em 16 % e UP em 37% dos pacientes.¹⁹ Um estudo recente realizado em Espanha apresenta uma prevalência de CT de 4,1% em mulheres e 4,3% em homens.²⁰

1.1 CHLAMYDIA

Inicialmente identificadas como protozoários e posteriormente consideradas vírus de grandes dimensões, ou ainda numa outra abordagem intermediários entre vírus e bactérias, a sua natureza bacteriana só ficou definitivamente esclarecida na década de 60 com os progressos da biologia celular, sobretudo com a microscopia eletrónica de transmissão.²¹

Estas pequenas bactérias gram-negativas, são parasitas intracelulares obrigatórios tal como os vírus, mas em oposição aos vírus, contêm simultaneamente RNA e DNA, parede celular e ribossomas procarióticos. Sintetizam as suas próprias proteínas, ácidos nucleicos e lípidos e têm a designação de “parasitas de energia” porque aproveitam o ATP que a célula que parasitam produz. A divisão destas bactérias é feita por fissão binária, e são sensíveis a vários antibióticos.

A sequenciação do código do DNA contrariou fundamentos até aí em vigor, pois revelou a presença de genes capazes de levar à produção de ATP e à biossíntese do peptidoglicano. Um dos genes desta bactéria assegura a produção de uma citolisina e os outros genes comparam-se aos de organismos superiores, o que de alguma forma ilustra a evolução dos eucariotas. Foram identificados genes de uma molécula semelhante à fosfolipase D que opera sobre os lípidos das células parasitadas.

A *Chlamydia* fabrica um lipopolissacarídeo (LPS) do tipo gram-negativo e pelo menos 2 proteínas de choque térmico, semelhantes a outras bactérias, o que explica as reações autoimunes na patogénese da infeção por *Chlamydia*.²²

Até 1999 o género *Chlamydia* era o único na família *Chlamydiaceae* e na ordem *Chlamydiales* e eram reconhecidas 4 espécies: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* e *C. pecorum*. Análises mais recentes de sequências de rRNA 16S e 23S demonstraram a necessidade de uma nova classificação taxonómica. A nova

classificação taxonómica propôs que a ordem *Chlamydiales* fosse subdividida em quatro famílias: (1) *Chlamydiaceae*, contendo dois géneros, *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. muridarum* e *C. suis*) e *Chlamydophila* (*Cph. pneumoniae*, *Cph. pecorum*, *Cph. abortus*, *Cph. caviae* e *Cph. felis*); (2) *Simkaniaceae*, para incluir *Simkania negevensis*; (3) *Parachlamydiaceae*, para incluir *Parachlamydia acanthamoeba* e (4) *Waddliaceae* para incluir *Waddlia chondrophila*.^{23,24}

No género *Chlamydia* a espécie com maior destaque para os humanos é a *Chlamydia trachomatis* onde se distinguem 2 biovars, segundo a sua ação patogénica e a capacidade de invasão das células em cultura:

→ Os agentes do tracoma, da conjuntivite de inclusão, da infeção óculo-genital e da artrite reativa.

→ Os agentes de infeção invasiva do trato genital associados a uma patologia linfoide: o Linfo Granuloma Venéreo (LGV).

Os 2 biovars dividem-se com base nos epítotos da proteína principal da membrana externa em 18 serovares²⁵, designados por letras de A a K mais Ba, Da, Ia, Ja no 1.º biovar e de L1, L2, L3 no 2.º biovar.

O genoma da *Chlamydia* é bastante pequeno, contém aproximadamente 600 kb.²⁶ A análise dos genomas das *Chlamydias*, mostra que codificam para aproximadamente 875 proteínas, e 70 destas são exclusivas de CT. Verificou-se que a região próxima à origem de replicação é onde existe a maior diversidade, esta região inclui genes que controlam a síntese de triptofano, e a sua utilização foi relacionada com a mediação do interferão gama (IFN γ) no desenvolvimento da infeção persistente.²⁷

1.1.1 Morfologia e Fisiologia

Foi observado por microscopia eletrónica na membrana externa da *Chlamydia*, projeções hemisféricas, semelhantes a cílios, que servem para aderir às células do hospedeiro.²⁸ São imóveis, e distinguem-se duas formas do ponto de vista morfológico e fisiológico: o corpo elementar (EB) - é a forma de multiplicação, é infeccioso, metabolicamente inerte, e com um diâmetro de 300-400 nm; e o corpo

reticular (RB) - é a forma de resistência e de propagação, não infeccioso, metabolicamente ativo, com um diâmetro entre 800 e 1000 nm (Figs. 1 e 2).

O EB comporta-se como um espora que garante a sobrevivência fora da célula do hospedeiro e é nele que se encontram os ácidos nucleicos (DNA e RNA).²⁹ A membrana externa do EB segrega proteínas extracelulares ricas em cisteína, unidas de forma cruzada a pontes dissulfeto, proporcionando-lhe proteção e forma.³⁰ As proteínas ricas em cisteína incluem a proteína OMP presente na membrana externa, esta tem um peso molecular de 40 kDa, constitui 60% do total das proteínas da membrana externa, está codificada pelo gene *omp1*, e contém antígenos de superfície.³¹

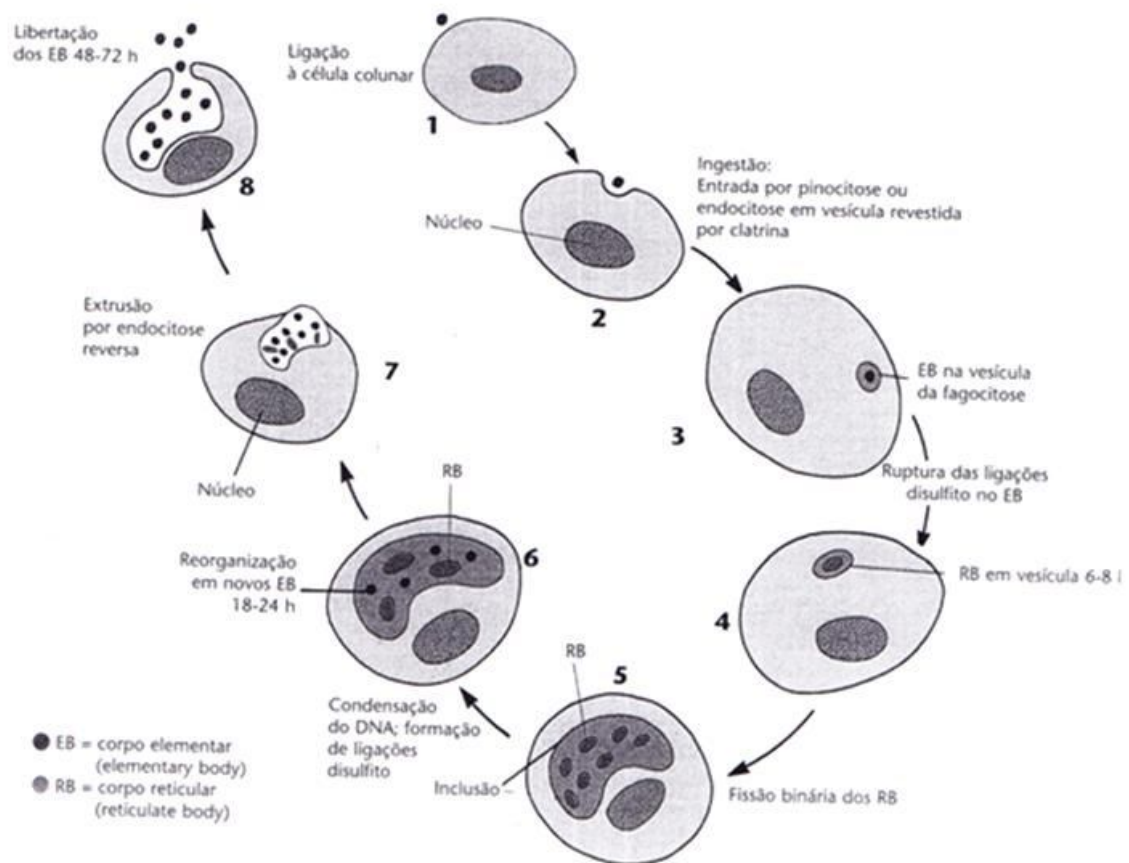


Fig. 1. Ciclo de crescimento da *Chlamydia*³²

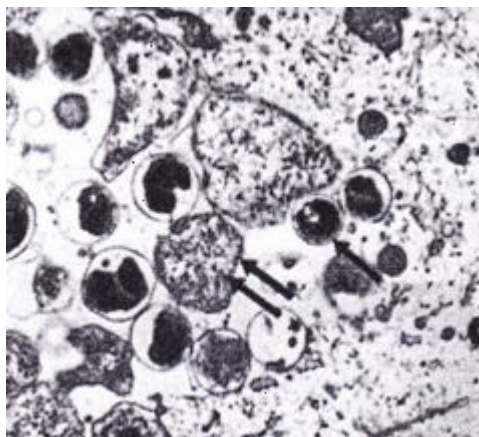


Fig. 2. Microfotografia eletrônica de um fino corte de inclusão de *Chlamydia* (→ Corpo elementar; ⇨Corpo reticular)³³

A proteína que se encontra no espaço periplásmico com um peso molecular de 69kDa, codificada pelo gene *omp2*, proporciona à *Chlamydia*, integridade semelhante à do peptidoglicano, o RB no entanto não contém esta proteína.^{34,35} A proteína codificada pelo gene *omp3* com um peso molecular entre 12-15 kDa é uma proteína hidrofílica que ajuda na adesão às células do hospedeiro.^{35,36}

A *Chlamydia trachomatis* tem proteínas antigénicas na membrana que induzem a ativação dos mecanismos imunológicos humorais e celulares, inclusive a produção de imunoglobulinas específicas das classes IgA, IgM e IgG bem como cromocitocinas, interleucinas, interferons e o fator de necrose tumoral.³⁷

As proteínas de choque térmico designadas por HSP70 bem como as HSP60, foram encontradas em mulheres com doença pélvica associada a CT.^{35,36} As HSP60 têm ainda um papel facilitador na carcinogénese cervical em doentes com infeção persistente por *Chlamydia trachomatis*. As proteínas HSP60 sintetizadas pela CT têm ação anti-apoptótica durante a infeção persistente, facilitando a atuação das oncoproteínas em células simultaneamente infetadas por alguns HPV de alto risco (nomeadamente o HPV tipo 16, 18).³⁸

A *Chlamydia* precisa de aminoácidos para se desenvolver, como a cisteína e o triptofano, o que significa que, se não os recebe, por ação, p. ex., do interferão γ , irá manter-se em estado de vida latente. Se porém dispuser dos meios necessários, a unidade metabólica (RB), sintetizará o seu próprio DNA, RNA e as suas proteínas.

O EB penetra nas células, aproveitando pequenas efrações na base das microvilosidades, e fica fechado no interior de uma vesícula. A fusão dessa vesícula

de endocitose com as vesículas dos lisossomas é inibida se a membrana externa da bactéria estiver intacta. Caso contrário a fagocitose continua o seu curso e a *Chlamydia* é destruída.

A *Chlamydia* permanecendo, consegue modificar o vacúolo e também a sua própria composição de maneira a aproximar-se da célula hospedeira. O EB vai tornar-se menos rígido por perda de ligações S-S, aumenta de volume e transforma-se ao fim de 6 a 8h na partícula RB.

O RB divide-se dentro da vesícula, por fissão binária, originando organismos-filhos muito pleomórficos. Entretanto o DNA condensa-se, estabelecem-se ligações S-S entre as proteínas da membrana externa, e formam-se em 18 a 24h novos EB. Às 48-72h a célula repleta de EB rompe-se e liberta os EB que vão contaminar outras células. Como o processo de crescimento é assíncrono observam-se RB, EB e microrganismos intermédios, de formas variadas, na mesma inclusão, a qual resulta do aglomerado de *Chlamydia* dentro do fagossoma.

A redução do número de ligações S-S entre as proteínas da membrana exterior, imediatamente após a penetração na célula hospedeira, justifica a perda da forma esférica rígida do RB.²¹

1.1.2 Patogénese e Imunidade

A *Chlamydia trachomatis* é considerada um dos patógenos de transmissão sexual mais prevalentes em todo o mundo. As infeções urogenitais causadas por CT resultam em múltiplas manifestações clínicas, incluindo cervicites, uretrites, e DIP, que podem conduzir a aborto e infertilidade. Dado que a infeção pode ser assintomática e que a infeção vaginal é predominantemente silenciosa pode ocorrer evolução para DIP num número significativo de casos (até 40%). Alertando para as sequelas de DIP, um estudo retrospectivo demonstrou maior predisposição para infertilidade em mulheres com DIP e cultura positiva para CT.³⁹

Apesar das implicações provadas do papel deste microrganismo, poucos estudos tiveram sucesso no seu isolamento da região endocervical de mulheres inférteis.^{2,7,40}

A CT contamina apenas algumas células, onde esta encontra recetores para o EB. Contamina células epiteliais não ciliadas, colunares, das mucosas da uretra, do endométrio, endocolo, trompas de Falópio, ânus e reto, do trato respiratório e das conjuntivas. O biovar responsável pelo LGV replica-se nos fagócitos mononucleares do sistema linfático e portanto gera granulomas.

O local mais comum da infeção por *Chlamydia trachomatis* no trato genital feminino é no endocolo, devido à sua preferência pelas células do epitélio cilíndrico. A sintomatologia é escassa e em cerca de 70% dos casos é assintomática.⁴¹

A infeção uterina durante a gravidez resulta na rutura prematura de membranas e em corioamnionite.² Abortos precoces e recorrentes podem ser induzidos por infeção assintomática por CT através da ação de mediadores imunitários: mulheres com historial de abortos recorrentes e insucesso de técnicas de fertilização *in vitro* (FIV) têm maiores titulações serológicas de IgG específicas para CT, e cerca de 41% sofre pelo menos um aborto espontâneo.⁴² Durante a gestação a anatomia do trato genital modifica-se, sendo que as paredes vaginais hipertrofiam-se e são mais vascularizadas, há um aumento no glicogénio do epitélio vaginal com uma diminuição significativa do pH. O colo uterino hipertrofia-se, podendo levar à exposição de uma área maior do epitélio colunar. Todas essas mudanças têm grande influência na flora microbiana vaginal da mulher grávida e algumas delas podem favorecer a penetração de certos agentes infecciosos, incluindo a CT.⁴³

Um estudo considerou a mulher uma fonte importante de retransmissão da bactéria para os seus parceiros e também para o feto. A transmissão materno-fetal ocorre por contato direto, após a rutura das membranas.⁴⁴ Nos homens diagnosticados com prostatite e CT positiva, existe uma associação com diminuição da fertilidade, considerando a baixa concentração de espermatozoides, motilidade espermática, alta fragmentação do DNA, o aumento de reação acrossómica, e morfologia anormal dos espermatozoides, nestes doentes.⁴⁵

Vários fatores de risco para a infeção por *Chlamydia trachomatis* têm sido descritos na literatura. Os principais fatores são o início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros e baixo nível socioeconómico. Outros fatores capazes de identificar os grupos de maior risco são caracterizados por ectopia cervical, história de DST prévia

e uso de terapêutica anticoncepcional. Em homens o fator de risco mais citado é idade inferior a 25 anos.⁴⁶

Dados disponíveis demonstram que DST, como a CT, facilitam a transmissão do HIV através de mecanismos biológicos, e que o tratamento precoce de DST como a CT deve fazer parte da estratégia global de prevenção do HIV.⁴⁷

1.1.3 Manifestações Clínicas

A *Chlamydia trachomatis* apresenta-se sob diversas manifestações clínicas. São a seguir apresentadas algumas das que têm maior expressão e cujas consequências têm mais impacto na sociedade.

- **Linfogranuloma venéreo (LGV) ou doença de Nicolas Favre**

Através de minúsculas feridas, os serovares L1, L2 e L3 da CT originam o LGV, doença frequente nas regiões tropicais e subtropicais e esporádica na Europa e EUA, aparentemente predominante no sexo masculino, porque nas mulheres é vulgarmente menos sintomática. Inicia-se por uma lesão genital, não dolorosa, que pode, ao fim de pouco tempo, “sara” sem chegar a ser detetada pelo paciente. Segue-se a linfadenopatia inguinal ou bubão. O bubão pode ser o ponto de partida da disseminação do microrganismo para o trato gastrointestinal e génito-urinário. A disseminação processa-se pela infeção das células do sistema reticuloendotelial (SRE), ou sistema mononuclear fagocitário, por via linfática, e faz-se acompanhar de febre, arrepios, anorexia, cefaleia, meningismo. Os abscessos devem-se à acumulação de agregados de células mononucleares rodeados por células endoteliais. Estas lesões podem sofrer necrose, atraindo polimorfonucleares (essencialmente neutrófilos) mas também linfócitos e plasmócitos. A inflamação espalha-se pelos tecidos subjacentes, e a consequente rutura do gânglio provoca novos abscessos ou fissuras, originando posteriormente úlceras genitais ou elefantíase genital. No caso das mulheres pode ainda ocorrer estreitamento retal.³²

- **Tracoma**

Os serovares A, B, Ba e C da *Chlamydia trachomatis*, prevalecem em países ou grupos de baixo nível de higiene, social e individual. A cegueira que resulta da infecção afeta muitos milhões de indivíduos desde o norte de África ao Sudeste Asiático. As crianças contraem frequentemente a doença antes do segundo ano de vida e representam o principal reservatório do microrganismo, no entanto a infecção diminuiu ao longo da adolescência. O tracoma passa de um olho para o outro através das gotículas oculares veiculadas pelas mãos, vestuário, ou exaladas pelo aparelho respiratório ou ainda por contaminação fecal. A doença começa com uma conjuntivite folicular, em que a inflamação alastra pela conjuntiva. As cicatrizes resultantes na conjuntiva levam à retração e ao conseqüente revirar das pálpebras, o que implica um constante traumatismo da córnea pelas pestanas.³²

- **Conjuntivite do adulto com inclusões – Paratracoma**

A conjuntivite folicular aguda proveniente de infecções genitais ocorre no adulto em qualquer região do mundo mais frequentemente entre os 18 e os 30 anos, ou seja, em jovens sexualmente ativos. O corrimento ocular mucopurulento é o primeiro sinal da doença. Observa-se conjuntivite folicular, infiltração e alguma vascularização da córnea. A transmissão é proveniente sobretudo dos órgãos genitais, de onde a bactéria é transferida para o globo ocular. A progressão para cegueira não é comum, devido à cura espontânea e, ao contrário do tracoma, a repetição da infecção é pouco comum. Porém também se observam cicatrizações da córnea nas infecções crônicas. Os serovares D a K da CT são os responsáveis deste quadro clínico.⁴⁸

- **Oftalmia neonatal**

Esta patologia deve-se à passagem da criança, durante o parto, por tecidos maternos infetados. Cerca de metade das crianças que nascem por vias naturais provenientes de uma mãe portadora de infecção por CT no colo uterino contraem a doença. Os serovares da CT implicados nesta patologia são do D a K. A incubação dura entre 5 a 12 dias, e no final desenvolve-se a tumefação das pálpebras e órbita, hiperemia, e

corrimento ocular purulento na conjuntiva.⁴⁸ A evolução da doença prolonga-se até 12 meses ou por vezes mais, deixando como sequelas cicatrizes e vascularização anormal da córnea. Existe também risco associado de pneumonia pela CT 6 semanas depois do parto.

- **Infeções urogenitais (à exceção do LGV)**

A CT é responsável por 30% dos casos de uretrite não gonocócica (UNG), no sexo masculino. É uma das doenças sexualmente transmitidas mais frequentes no mundo e as recidivas repetem-se frequentemente. Contudo a infeção é muitas vezes assintomática (fig. 3). No sexo masculino, ocasionalmente, a infeção progride para epidermite ou prostatite especialmente depois dos 35 anos e provavelmente a forma crónica induz esterilidade por obstrução do canal espermático e daí azospermia.³²

A proctite pode manifestar-se tanto em homens como em mulheres. Na maioria dos casos os serovares D a K são os responsáveis por estas patologias. Na mulher, uma grande percentagem das infeções mantém-se assintomática, sendo habitualmente os serovares D a K os responsáveis pela infeção.

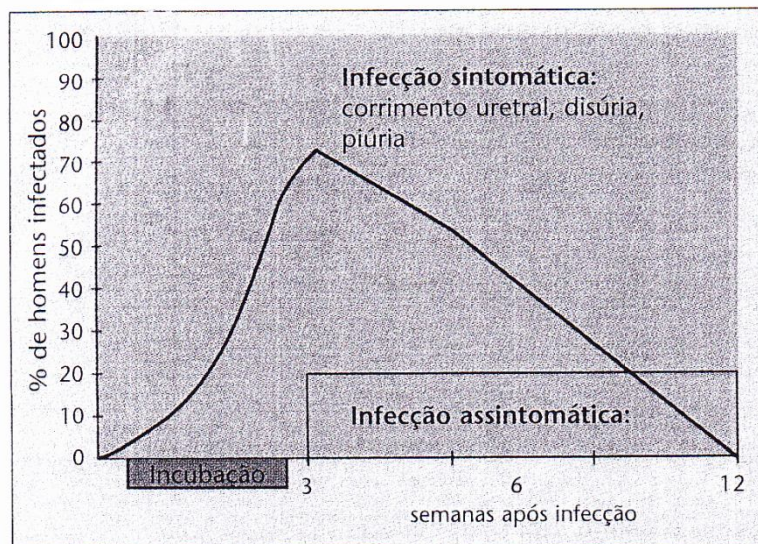


Fig. 3 – Evolução da infeção (uretrite) não tratada⁴⁹

Por vezes a infeção revela-se por uretrite, vaginite e após ascensão, cervicite, endometrite, infeção aguda das trompas e, por fim infertilidade. A DIP que abrange

as salpingites e as endometrites é, nos países desenvolvidos, amplamente causada por CT e explica muitas vezes as dores pélvicas em mulheres jovens. A salpingite não tratada pode fomentar cicatrizes e oclusões tubárias as quais, se bilaterais, culminam em infertilidade. A gravidez ectópica, as peri-apendicites, e as peri-hepatites (síndrome de Fitz-Hugh-Curtis) podem dever-se a esta etiologia. Os tratamentos de fertilidade, a cirurgia abdominal, e a algia podem ser evitados pela confirmação da infecção por CT em mulheres jovens.

De referir ainda que não são raras as infecções por múltiplos microrganismos associados. Por exemplo em situações em que se manifestam em simultâneo a *Neisseria gonorrhoeae* (NG) e a CT, depois de tratada a NG, prosseguem as queixas porque o tratamento usual contra a NG, frequentemente à base de β -lactâmicos, não afeta a CT.

No sexo masculino a NG e CT em conjunto, representam o grosso das etiologias da epididimite até aos 35 anos. Cerca de 80% dos diagnósticos de síndrome de Reiter em homens (inflamação em várias articulações, conjuntivite e inflamação do sistema urinário) tem origem em infecções genitais por CT. De salientar ainda que 15% das proctites diagnosticadas em homossexuais masculinos estão também associadas a CT.³²

1.1.4 Diagnóstico Laboratorial

A sensibilidade e especificidade dos testes de diagnóstico têm relação direta com a amostra utilizada. Para o exame cultural e pesquisa direta da *Chlamydia* utiliza-se, tradicionalmente, o exsudado endocervical ou uretral. Para os testes de amplificação podem ser usadas também amostras de urina e exsudado vaginal. Nos testes indiretos, é recomendada especial atenção para a possibilidade de reações cruzadas interespécies.

As metodologias laboratoriais para o diagnóstico direto e indireto da infecção por *Chlamydia trachomatis* são:

- Exame cultural
- Pesquisa de antígenos: Imunofluorescência direta (DFA)
ensaioimunoenzimático (EIA)

- Pesquisa de ácidos nucleicos: Sonda de DNA e Amplificação (PCR, LCR, TMA)
- Pesquisa de anticorpos: Imunofluorescência indireta (IFI) Microimunofluorescência indireta (MIF) ensaio imunoenzimático indireto (EIA)

O exame cultural é considerado o teste padrão no diagnóstico. Geralmente utiliza-se zaragatoa endocervical ou uretral para a colheita. O meio de crescimento mais utilizado para a cultura é o de McCoy. A presença de inclusões citoplasmáticas de corpos elementares e reticulares, após o tecido ter sido corado com anticorpo monoclonal fluorescente, indica positividade do teste. Possui sensibilidade de 70-85% e especificidade de 100%. O custo elevado, a demora no resultado (48-72h após a inoculação) e os cuidados para manter os microrganismos viáveis são os aspectos desfavoráveis do método.^{50,51}

A imunofluorescência direta consiste na identificação dos corpúsculos elementares com o uso de anticorpos monoclonais fluorescentes. Possui sensibilidade na ordem dos 85% e especificidade de 98%, quando comparado ao exame cultural. A colheita é efetuada normalmente por zaragatoa endocervical. As estruturas antigénicas são visualizadas através do uso de anticorpos monoclonais contra o LPS ou o MOMP. O MOMP oferece menos resultados falsos positivos, por ser mais específico, já o LPS favorece as reações cruzadas com outras bactérias ou subtipos de *Chlamydia*. A técnica e interpretação dos resultados exigem experiência, uma vez que, as ligações inespecíficas dos anticorpos levam a resultados falso-positivos.^{50,52}

O ensaio imunoenzimático (EIA) deteta o antígeno LPS ou MOMP através de anticorpos mono ou policlonais marcados com enzimas. O resultado final é visualizado por fotometria, fluorescência ou quimiofluorescência. Semelhante à imunofluorescência, quando utilizados anticorpos anti-LPS, o teste fica sujeito a reações cruzadas com o LPS de outros microrganismos, como algumas bactérias gram-negativas (*Acinetobacter* sp., *Gardnerella*, Neisserias, Salmonelas e algumas enterobactérias), revelando resultados falsamente positivos. A sensibilidade ronda os 62-75% e a especificidade próxima de 98%.^{50,52} Tem a vantagem de poder ser realizado em equipamento automatizado e de utilizar um anticorpo bloqueador, aumentando a especificidade do teste. Forward comparou o EIA com a PCR para a

deteção de CT, observando um aumento de 46% na sensibilidade de identificação a favor da PCR.⁵³

No que diz respeito à pesquisa de anticorpos, apesar da alta resposta imunológica às infecções por *Chlamydia*, a serologia não é o melhor método para o seu diagnóstico. Não deve ser utilizado para *screening*, uma vez que, infecções prévias para CT podem deixar níveis séricos de anticorpos elevados, tornando difícil a distinção temporal de um processo infeccioso. Além disso, podem ocorrer reações cruzadas com outras espécies de *Chlamydia*. Podem ser usadas técnicas de imunofluorescência indireta, ensaio imunoenzimático indireto e a micro imunofluorescência indireta. Estas técnicas detetam anticorpos contra o antígeno LPS dos corpos elementares ou reticulares. Quando forem doseados separadamente anticorpos IgG, IgM e IgA, podemos considerar positivo para infecção recente se houver presença de IgA e/ou IgM e IgG com aumento significativo (pelo menos o dobro) entre uma amostra colhida na fase aguda e outra amostra colhida na fase convalescente. A micro imunofluorescência é a mais sensível das técnicas e tem a vantagem de ser espécie e subespécie-específica, porém, é laboriosa e de elevado custo.⁵⁰⁻⁵²

A pesquisa de ácidos nucleicos pode ser feita através de sondas de DNA ou da amplificação de ácidos nucleicos. Sondas de DNA com sequência complementar ao RNA ribossomal 16S do genoma da *Chlamydia* e marcadas com éster de acridina, ao hibridizar com o DNA da CT são absorvidas por magnetismo, e a reação é quantificada com uso de luminômetro. A sua sensibilidade ronda os 75% e a especificidade entre 95-99%. É um teste que ganhou cada vez mais espaço, especialmente pelo facto de ser rápido na obtenção dos resultados (2-3h) e habilidade de produzir resultados fidedignos em amostras colhidas de forma não invasiva, com microrganismos não viáveis.⁵⁰⁻⁵² O Teste de Amplificação de Ácidos Nucleicos (NAAT) consiste na amplificação de sequências de ácidos nucleicos específicos do microrganismo em estudo, pela obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* de uma sequência de DNA alvo. Os *primers* definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica. É capaz de detetar pequenas quantidades de ácidos nucleicos.^{54,55} Os testes comerciais podem diferir na técnica, sendo os principais a “Polymerase Chain Reaction” (PCR), a “Ligase Chain Reaction” (LCR) e a “Transcription-Mediated Amplification Assay” (TMA). A PCR e a LCR amplificam uma sequência de nucleótidos do plasmídeo,

enquanto a TMA é dirigida à porção 23s do RNA ribossomal da *Chlamydia*.⁵⁶ Os testes de amplificação têm sensibilidade de 77 a 93%, ou seja, cerca de 20% maior do que a cultura.

Quando comparou os resultados entre PCR realizada a partir de secreção cervical e realizada a partir de amostra urinária, George et al, identificou sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo e negativo de 100%, 98%, 96% e 100%, respetivamente, para amostra genital e 82%, 100%, 100% e 92%, respetivamente, para amostra urinária.⁵⁷ A sensibilidade da PCR cervical é maior quando está presente secreção endocervical mucopurulenta (84%).⁵⁸ As amostras endocervicais na mulher demonstram maior sensibilidade do que as de urina, no entanto nos homens assintomáticos as amostras de urina superam as zaragatoas uretrais.³² Watson e colaboradores concluíram também que os testes de amplificação do ácido nucleico usados em amostras não-invasivas, como urina, são mais efetivos para detetar infeção assintomática que testes convencionais.⁵⁹ As desvantagens destes testes relacionam-se aos custos elevados e à possibilidade de problemas relacionados com inibição. São mais dispendiosos que outros métodos não-culturais, mas, de menor custo que a cultura. Não existe consenso científico acerca do método mais indicado para o rastreio desta bactéria,⁴⁰ no entanto a PCR, que pertence à classe das NAAT é considerado o teste de escolha para diagnóstico de CT.^{2,40}

As amostras usadas para a realização deste estudo foram as seguintes:

- Nas mulheres: zaragatoa vaginal, endocolo, vulva e uretra, e o primeiro jato de urina.
- Nos homens: zaragatoa uretral e retal, esperma e primeiro jato de urina.

O teste usado neste estudo foi o COBAS[®] 4800 para *Chlamydia trachomatis* e baseia-se em 2 processos principais: (1) preparação automatizada para obter ácidos nucleicos – DNA (2) amplificação por PCR de sequências de DNA alvo, usando pares de iniciadores complementares específicos para a CT, e deteção em tempo real das sondas de deteção oligonucleotídicas específicas para a CT, marcadas com corante fluorescente e clivadas. Durante a preparação automatizada de amostras, é adicionado a todas as amostras controlo interno contendo DNA de CT, e é

amplificado e detetado simultaneamente com cada amostra para controlar todo o processo interno.

A preparação de amostras é automatizada com a utilização do equipamento cobas x 480. As amostras são lisadas no próprio dispositivo de colheita ou durante a preparação de amostras pelo agente caotrópico em meio cobas. Os ácidos nucleicos libertados, juntamente com o DNA do controlo interno da CT, são purificados através da absorção das partículas de vidro magnéticas, lavados e finalmente separados destas partículas, tornando-os prontos para amplificação e deteção por PCR.

O reagente de mistura principal contém pares de iniciadores e sondas específicas para o DNA plasmídeo críptico da CT, para o DNA cromossómico do gene *ompA* da CT e para o DNA do controlo interno da CT.

1.1.5 Tratamento e Prevenção

O tratamento para estas infeções genitais, recomendado pelo Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC), incluiu a administração de Azitromicina (1g), numa toma oral única, ou de Doxiciclina (100mg) em duas tomas diárias durante 7 dias por via oral.⁶⁰ O tratamento destas infeções incluem obrigatoriamente o ou os parceiros sexuais.

O tratamento da infeção por *Chlamydia trachomatis* durante a gravidez tem provado ser benéfico na prevenção da morbidade neonatal e é recomendado pelo CDC.⁶¹ Um dos tratamentos de escolha na gravidez é o estearato de eritromicina, uma vez que a tetraciclina e os seus derivados estão contraindicados nesse período. Outra alternativa seria o uso da amoxicilina, especialmente para mulheres com maior intolerância gástrica. A desvantagem do uso da eritromicina consiste na possível presença de efeitos adversos no trato gastrointestinal, tais como náuseas, vómitos e epigastralgia que contribuem em muitos casos para a interrupção do tratamento.⁶²

Como para todas as doenças sexualmente transmissíveis a única forma de prevenção é a adoção de comportamentos sexuais seguros, evitando as relações sexuais com

múltiplos parceiros e cujo passado sexual se desconhece, e usando sempre preservativo, em particular se não se trata de um parceiro sexual estável.

A identificação e tratamento dos parceiros sexuais das pessoas infetadas, sempre que possível, contribui para reduzir a disseminação da doença. Como as infecções silenciosas são frequentes tanto no homem como na mulher, devem ser propostos testes periódicos de rastreio às pessoas consideradas de maior risco (com parceiros sexuais múltiplos e prática de sexo não protegido), com o objetivo de evitar a propagação da doença.

Não estão previstas ainda vacinas eficazes contra as clamidioses humanas. A dificuldade está em manter as respostas imunológicas à superfície das mucosas, tendo especial relevância a imunidade mediada por linfócitos auxiliares T1.

1.2 MYCOPLASMA E UREAPLASMA

O *Mycoplasma* e o *Ureaplasma* pertencem à classe *Mollicutes*, à ordem *Mycoplasmatales* e à família *Mycoplasmataceae*. Para o Homem as espécies que têm sido consideradas como as mais importantes são as seguintes: (i) *Mycoplasma pneumoniae*, (ii) *Mycoplasma hominis*, (iii) *Ureaplasma urealyticum* e (iv) *Mycoplasma genitalium*.

Os *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas* são bactérias sem parede celular e de pequenas dimensões (0.2-0.8 μm de diâmetro) e por passarem os filtros que retêm bactérias foram inicialmente considerados vírus. Contudo, por possuírem os dois tipos de ácido nucleico (RNA e DNA) foram posteriormente deixados de ser considerados vírus. Por outro lado, são os mais pequenos organismos que podem ter vida livre na natureza e auto-replicação em meios de cultura. Dada a ausência de parede celular não coram pela técnica de Gram, sendo refratários à ação dos antibióticos inibidores da biossíntese do peptidoglicano (ex. β -lactâmicos). Estas bactérias apresentam fragilidade osmótica, são pleomórficas, com formas diversas tais como esféricas, piriformes, filamentosas ramificadas ou helicoidais. A replicação do seu genoma precede, não obrigatoriamente, a divisão celular, assim formam-se gémulas e cadeias com aspetos de pérolas. São geralmente imóveis, embora algumas espécies possuam motilidade. Devido ao seu pequeno genoma (580-1160 kb), estas bactérias são de

crescimento fastidioso e exigentes nutricionalmente. Certas estirpes, requerem no entanto culturas celulares para o seu desenvolvimento, apresentando baixo teor de G+C no DNA, que se situa entre 23 a 40%. Muitas espécies são anaeróbias facultativas e outras são anaeróbias obrigatórias. São parasitas, comensais ou saprófitas, sendo muitas espécies patogénicas para o Homem, para outros animais, bem como para vegetais e insectos.²¹

Nos seres humanos, a infeção por *Ureaplasma* urogenital é causada por duas espécies, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, com um total de 14 serovares. O UU tem características do biovar T960T (biovar 2 ou A), e inclui 10 grandes serovares genómicos: 2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13, enquanto o UP tem características de biovar parvo (biovar 1 ou B) e inclui quatro serovares: 1, 3, 6 e 14.^{63,64} A divisão das espécies só foi possível através de técnicas moleculares como a PCR, por isso ainda são por vezes consideradas juntas como *Ureaplasma spp.* A diferenciação de espécies de *Ureaplasma* é importante, pois alguns estudos sugerem que existe de facto uma diferenciação nos efeitos provocados por cada uma destas espécies.

Os *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas* aderem fortemente ao epitélio do trato urogenital e raramente invadem tecidos ou a corrente sanguínea. Assim podem ser considerados como parasitas superficiais, especialmente das mucosas.²¹

Estes microrganismos são transmitidos em humanos através de contacto direto entre hospedeiros (venereamente por contacto genital-genital ou genital-oral), verticalmente da mãe para o feto ou recém-nascido ou nosocomialmente através do transplante de tecidos.⁶⁵

1.2.1 Patogenicidade

Embora alguns *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas* sejam comensais e pertençam à flora normal das mucosas humanas, muitas espécies são patogénicas tanto para o Homem como para outras espécies animais, provocando uma grande diversidade de doenças que tendem a tornar-se crónicas.²¹ O *Mycoplasma hominis* e o *Ureaplasma spp.*, conhecidos coletivamente como *Mycoplasmas* genitais, são geralmente considerados oportunistas, que causam infeções invasivas em populações suscetíveis.⁶³

Os possíveis comportamentos dos *Mycoplasmas* genitais em doenças do trato reprodutor feminino têm sido debatidos desde a década de setenta. A sua presença tem sido congruentemente associada a múltiplas complicações obstétricas incluindo infertilidade, aborto espontâneo, morbidade neonatal e mortalidade perinatal. Existem indícios de que o tempo, duração, e intensidade da resposta inflamatória à infecção por *Mycoplasmas*, são os principais determinantes dos resultados gestacionais e neonatais.^{63,66,67}

Diversos estudos indicam que a presença de UU estão associados UNG, resultados adversos da gravidez relacionados com o peso ao nascer, idade gestacional, ruptura prematura de membranas, corioamnionite, parto prematuro, propensão ao aborto, bem como formação de cálculos no aparelho urinário e doença pulmonar em crianças prematuras.^{68,69,70,71} Porém, a colonização da placenta associa-se frequentemente a corioamnionite histológica (38-66%) e constitui um fator importante para morbidade da gravidez e aborto espontâneo.^{42,72} A colonização de UU no endométrio é significativamente maior em casos de abortos recorrentes (28%) e associa-se a infertilidade inexplicada em 26 a 50% dos casos.^{73,74} Em todos os casos de endometrite, este agente foi simultaneamente identificado no muco cervical, indicando uma rota ascendente de disseminação para a cavidade uterina.⁷³ Stein et al, verificou que a prevalência de aborto foi maior em placentas com culturas positivas para *Mycoplasmas* genitais (45%), do que em placentas infetadas por outras espécies (33%) ou em placentas estéreis (2,5%).⁷² Outro estudo refere que espécies de *Mycoplasma* têm sido identificadas em amostras endometriais e vaginais de casos de DIP não associada a CT nem NG⁷⁵, e a incidência do biovar T960 do UU é superior em casos de DIP (57%) e em mulheres com aborto antecedente (42%).⁷⁶

Ao UP estão associadas infecções do trato urinário.^{68,69,70,71} Um outro estudo demonstrou que UP sorotipo 6, foi significativamente associado com a presença da flora vaginal normal.⁷⁷ Motivos pelos quais o UP é a espécie mais comumente isolada em amostras clínicas.⁷⁸

O MH, um habitante comum dos tratos genital e urinário humano, é responsável por salpingite na mulher. É considerado também responsável por síndromas febris pós-parto e pós-aborto, bem como por pielonefrites e infecções genitais que podem conduzir a DIP.²¹ A *Trichomonas vaginalis* estabelece uma relação de simbiose com

MH e pode contribuir para a infertilidade ao influenciar a patogenia do MH.⁷⁹ Por outro lado o UU é considerado como um causador reconhecido de infertilidade em homens ao reduzir a qualidade do sêmen e o potencial de fertilização do espermatozoide.⁸⁰ Para além disso, também os homens infetados por MH apresentam uma redução da motilidade e da concentração de espermatozoides, e ainda alterações na sua morfologia⁸¹, em contrapartida a infeção por UU ou infeções mistas evidenciam um aumento na viscosidade e pH do fluido seminal.⁸² Um outro estudo refere que os *Mycoplasmas* são capazes de se fixar ao espermatozoide e reduzir a sua motilidade, demonstrando assim mais uma vez a sua associação com a infertilidade masculina.⁸³

Embora os *Mycoplasmas* tenham sido descritos como produtores de infeções transmitidas sexualmente, o seu papel patogénico ainda é controverso porque podem fazer parte da flora normal do trato genital de mulheres sexualmente ativas.⁸⁴ Aquando da determinação do significado clínico da infeção por estas bactérias, a diferenciação de colonização e infeção é importante devido à alta prevalência destas bactérias em populações saudáveis.⁸⁵

1.2.2 Mecanismos de infeção

Dado que a aderência dos *Mycoplasmas* às células humanas é extremamente forte, estes não são eliminados nem por secreções mucosas nem pelo fluxo de urina, tornando-se desta forma bastante difícil a sua eliminação. Nestas bactérias, devido à ausência de parede celular, e de quaisquer apêndices ou fímbrias, associados à aderência de outros procariontes, corrobora-se que adesinas micoplásmicas façam parte da membrana citoplasmática. A ausência de parede celular facilita ainda o contacto entre as membranas do parasita e do hospedeiro. Embora seja questionável a evidência da fusão das duas membranas, há indício de trocas antigénicas entre as mesmas. A íntima associação entre as membranas das células hospedeiras e parasitas cria um ambiente em que as concentrações locais de subprodutos relativamente tóxicos, excretados pela bactéria, tais como peróxido de hidrogénio e amónia, podem causar lesões nos tecidos. Embora, os *Mycoplasmas* possam ser fagocitados na ausência de anticorpos específicos, eles permanecem viáveis dentro das células fagocitárias, podendo assim ser transportados no interior de neutrófilos para as várias

partes do corpo onde podem dar início à infecção. Uma vez que anticorpos específicos inibem o crescimento de *Mycoplasmas in vitro*, o papel destes anticorpos, aparentemente, é o de controlar o seu crescimento à superfície das mucosas. Por outro lado, os neutrófilos podem também ajudar na dissipação da infecção.²¹

A indução de resposta inflamatória intrauterina e endometrite será um mecanismo pelo qual microrganismos infecciosos como UU, e agentes de Infecção Sexualmente Transmissível (IST) levam ao insucesso de técnicas de Procriação Medicamente Assistida e impedem a fertilização e manutenção de uma gravidez.⁸⁶

1.2.3 Suscetibilidade aos Antibióticos

Os *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas* não são afetados por beta-lactâmicos ou vancomicina por não possuírem peptidoglicano. Também não são suscetíveis a sulfonamidas e trimetoprim, já que não sintetizam ácido fólico. No entanto, são geralmente sensíveis a alguns antibióticos que interferem com a síntese proteica, como as tetraciclinas.

Os *Ureaplasmas* são geralmente sensíveis aos macrólidos, e resistentes às lincosamidas, exceto em altas concentrações.

O MH, em contraste, é naturalmente resistente à eritromicina, *in vitro*, mas sensível a macrólidos de 16 membros (josamicina e miocamicina) e lincomicina. Determinou-se que a base genética para a resistência aos macrólidos em MH é devido a mutações em genes correspondentes ao circuito do peptidil transferase (domínio V) no rRNA 23S.

Apesar de um relatório sobre resistência de alto grau à eritromicina em *Ureaplasmas*, na década de 1980, tal resistência aos macrólidos nestes organismos é extremamente incomum, e nenhum mecanismo para resistência aos macrólidos em *Ureaplasmas* foi verificado ao nível do ribossoma. Os resultados dos testes de sensibilidade deste organismo estão sujeitas à influência de uma série de fatores ambientais que podem resultar em concentrações mínimas inibitórias falsamente elevadas. Na mesma década foi descrito a aquisição do determinante tetM que medeia a resistência às tetraciclinas em espécies *Ureaplasma* e MH. Até à data, este é o único mecanismo de

resistência às tetraciclinas descrito nestes organismos. A frequência de resistência às tetraciclinas em *Mycoplasmas* genitais é, provavelmente, influenciada por fatores geográficos, uso indiscriminado de antibióticos e promiscuidade sexual. A resistência às tetraciclinas em MH ocorre em até cerca de 40% de isolados clínicos e em *Ureaplasmas* tem sido referido em cerca de 10%.⁶³

1.2.4 Diagnóstico Laboratorial

O local de colheita da amostra para o diagnóstico laboratorial está relacionado com a clínica (sinais e sintomas) comunicados pelas doentes ao seu médico ou por ele observados quando do exame objetivo em ato de consulta médica, sendo também prescritos em situação de rotina. Seguem-se os seguintes critérios: urina de 1º jacto (método de recolha não invasivo) para rastreio; exsudados vaginais (mulher) e uretrais (homem) quando à suspeita de UNG, e exsudado do endocolo quando a suspeita é de infeção profunda (salpingite), e também na consulta de infertilidade.

No diagnóstico laboratorial das infeções por *Mycoplasma* e *Ureaplasma* podem usar-se métodos culturais e não culturais.

Métodos culturais: Diversos meios de cultura, líquidos e sólidos complexos, podem ser usados para o isolamento e identificação de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, como é o caso do caldo PPLO, e do meio SP4, suplementado com extrato de levedura, soro de cavalo ou soro bovino fetal, a que se adiciona penicilina ou derivados. Primeiro é feita uma inoculação das amostras clínicas em caldos e posterior passagem para meios de cultura sólidos. Os meios de cultura líquida contendo glucose e um indicador de pH, permitem visualizar a fermentação, o que comprova o crescimento bacteriano, ou então usar meios contendo arginina e/ou ureia.²¹ As colónias de MH e de UU crescem em 1 a 5 dias. As colónias de UU são redondas de contorno negro acastanhado, e as de MH são redondas com centro mais escuro rodeado por larga auréola mais clara. Vários antibióticos incorporados no meio inibem o crescimento da maioria das bactérias gram-positivo e gram-negativo.³² Existem também *kits* comerciais de identificação de MH e UU que permitem fazer o diagnóstico das infeções genitais e a avaliação da suscetibilidade aos antibióticos, no entanto não distinguem UU de UP.²¹

Os métodos não culturais, ou métodos de diagnóstico direto como a imunofluorescência direta, sondas de ácidos nucleicos, ELISA, têm a vantagem de ser métodos mais rápidos e dotados de maior sensibilidade e especificidade.

Dada a dificuldade de obtenção de crescimento do *Mycoplasma* e *Ureaplasma in vitro*, são aconselhadas técnicas de hibridização de ácidos nucleicos e de amplificação genética para a identificação destas bactérias. Nas técnicas de PCR são utilizados *primers* de DNA específicos para diversas espécies de *Mycoplasma* e para os *Ureaplasma*, facilitando o diagnóstico clínico microbiológico.²¹ Estes métodos permitem também a distinção entre espécies de *Ureaplasma* (UU/UP).

1.2.5 Tratamento e Prevenção

O tratamento das infeções genitais provocadas por MH e UU, recomendado pelo CDC, é o mesmo que o aplicado no caso da CT já referido no ponto 1.1.5.

O facto de haver distinção através dos métodos moleculares entre UU e UP faz com que a antibioterapia apenas seja administrada no caso de a infeção ser causada por UU, que é a forma patogénica. Antes de existir esta distinção todos os casos eram referenciados para administração de antibioterapia. No caso do UP não se procede a antibioterapia por este não ser considerado patogénico.

É importante salientar que esses microrganismos são frequentemente oportunistas e podem estar presentes simultaneamente com outros patógenos e as decisões sobre a terapêutica a aplicar devem refletir sobre essa possibilidade.⁶⁵

Um estudo demonstrou que numa pequena série de casos de mulheres com invasão microbiana da cavidade amniótica, o uso de Azitromicina parentérica erradicou o *Ureaplasma* numa proporção de 3 em cada 4 casos, e os nascimentos ocorreram de forma normal. A combinação de antibióticos com anti-inflamatórios pode melhorar a eficácia do tratamento.⁷⁸ No caso das infeções neonatais por *Ureaplasmas* opta-se normalmente pelo uso de macrólidos.⁶⁵

A deteção precoce destas infeções determina a evolução da doença.

A prevenção destas infeções é a mesma que a da CT já referida no ponto 1.1.5.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização deste estudo recorreu-se a dados de 16 020 utentes que correspondem a 25 685 pedidos de análises relativos a *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, recolhidos de exsudados do endocolo, vaginais, uretrais, retal e vulvar, urina e esperma, no período compreendido entre Janeiro de 2009 e Maio de 2011. Os dados usados neste estudo são omissos na identificação dos utentes e foram obtidos através da base de dados do laboratório Dr. Joaquim Chaves.

As colheitas foram realizadas com kits de amostras de urina/amostras ginecológicas COBAS[®] PCR. Estes kits estão munidos com o meio COBAS[®] PCR que estabiliza o ácido nucleico permitindo assim a conservação das amostras.

2.1 TÉCNICA USADA PARA A DETECÇÃO DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS

- Amplificação por PCR

Seleção do alvo

Para além do DNA cromossómico, a CT contém um plasmídeo críptico de cerca de 7 500 pares de bases, que é comum a todos os serovares da CT. O teste COBAS[®] 4800 utiliza os iniciadores da CT CP102 e CP103 para definir uma sequência de aproximadamente 206 nucleótidos dentro do DNA plasmídeo críptico da CT. Para além disso, o teste COBAS[®] 4800 utiliza os iniciadores de CT CTMP101 e CTMP102 para definir uma sequência de aproximadamente 182 nucleótidos dentro do DNA cromossómico da CT.

Amplificação do alvo

As amostras processadas são adicionadas à mistura de amplificação numa microplaca, na qual ocorre a amplificação por PCR. A mistura de reação é aquecida, para separar o DNA isolado de cadeia dupla, e para expor as sequências alvo do iniciador. À medida que a mistura arrefece, os iniciadores ligam-se ao DNA alvo. A polimerase do DNA Z05, na presença de Mn^{2+} e de dNTPs em excesso, alonga os

iniciadores ligados ao longo dos modelos alvo para produzir DNA de dupla cadeia. Este procedimento completa o primeiro ciclo da PCR, dando origem a uma cópia de DNA de dupla cadeia das regiões alvo do DNA da CT e do DNA do controlo interno da CT. A repetição deste processo, resulta na amplificação do DNA entre as sequências alvo do iniciador, produzindo uma molécula de DNA de cadeia dupla denominada *amplicon*. O analisador cobas z 480 repete automaticamente este processo durante um determinado número de ciclos, cada um com o objetivo de duplicar a quantidade de DNA *amplicon*. O número de ciclos está pré-programado no software COBAS[®] 4800. A amplificação ocorre apenas nos alvos específicos de CT nos respetivos iniciadores. Não são amplificados nem o plasmídeo críptico inteiro da CT nem os genomas de CT.

Amplificação do controlo interno

O controlo interno de CT é uma combinação de dois DNAs plasmídeos recombinantes não infecciosos, cada um com regiões de ligação do iniciador idênticas às das sequências genómicas alvo da CT. Ambos os DNAs plasmídeos recombinantes têm uma sequência alvo interna idêntica aleatória, e uma região de ligação da sonda única, que permite que o controlo interno de CT se distinga do *amplicon* alvo. Estas características foram selecionadas para garantir a amplificação independente do controlo interno da CT e do DNA alvo da CT. O reagente do controlo interno da CT está incluído no teste COBAS[®] 4800 CT e é introduzido em cada amostra no equipamento cobas x 480 durante o processamento da amostra.

- Detecção de produtos da PCR no teste COBAS[®] 4800

O teste COBAS[®] 4800 utiliza tecnologia de PCR em tempo real. A utilização de sondas fluorescentes permite a deteção em tempo real da acumulação de produtos da PCR, monitorizando a intensidade da emissão dos corantes fluorescentes libertados durante o processo de amplificação. As sondas incluem sondas oligonucleotídicas específicas para o plasmídeo críptico da CT, para o *ompA* CT, e para o controlo interno da CT, todos com um corante sinalizador e um supressor. Quando as sondas marcadas com corante fluorescente estão intactas, a fluorescência sinalizadora é suprimida pela proximidade do corante supressor, devido aos efeitos de transferência

de energia do tipo Forster. Durante a PCR, as sondas hibridizam-se à respectiva sequência alvo e são clivadas pela atividade da nucleasse 5' a 3' da polimerase do DNA Z05 termoestável. Uma vez separados o sinalizador e o supressor, a supressão deixa de ocorrer, e aumenta a emissão fluorescente dos corantes sinalizadores. A amplificação da CT alvo e do controlo interno da CT são medidas independentemente e a comprimentos de onda diferentes. Este processo é repetido durante um determinado número de ciclos, sendo a intensidade da emissão dos corantes sinalizadores individuais aumentada em cada ciclo.

2.2 TÉCNICA USADA PARA A DETEÇÃO DE MYCOPLASMA HOMINIS

A deteção por PCR é baseada na amplificação da região específica do genoma do patogene usando *primers* específicos MH. Na PCR em tempo real, os produtos amplificados são detetados usando corantes fluorescentes. Estes corantes ligam-se às sondas de oligonucleotidos que se ligam especificamente aos produtos de amplificação. A monitorização na PCR em tempo real da intensidade de fluorescência permite a deteção de produtos acumulados sem reabertura dos tubos de reação depois do início da corrida de PCR. O kit de PCR AmpliSens® *Mycoplasma hominis*-FRT é um teste qualitativo que contém um controlo interno que é usado no procedimento de isolamento a fim de controlar o processo de isolamento de cada amostra individualmente e identificar possíveis reações inibitórias. O kit de PCR AmpliSens® *Mycoplasma hominis* -FRT usa “hot-start”, que reduz substancialmente a frequência de reações não específicas. “Hot-start” é garantido por separação de nucleótidos e taq polimerase, usando polimerase modificada quimicamente (TaqF). A polimerase modificada quimicamente (TaqF) é ativada por aquecimento a 95° C durante 15 min.

2.3 TÉCNICA USADA PARA A DETEÇÃO DE UREAPLASMA UREALYTICUM/ UREAPLASMA PARVUM

A deteção por PCR é baseada na amplificação da região específica do genoma do patogene usando *primers* específicos UU/UP. Na PCR em tempo real, os produtos amplificados são detetados usando corantes fluorescentes. Estes corantes ligam-se às

sondas de oligonucleotidos que se ligam especificamente aos produtos de amplificação durante o ciclo térmico. A monitorização na PCR em tempo real da intensidade de fluorescência permite a deteção de produtos acumulados sem reabertura dos tubos de reação depois do início da corrida de PCR. O kit de PCR AmpliSens® U.parvum/ U. urealyticum-FRT é um teste qualitativo que contém um controlo interno. Este é usado no procedimento de extração a fim de controlar o processo de extração de cada amostra individualmente e identificar possíveis reações de inibição. O kit de PCR AmpliSens® U.parvum/ U.urealyticum-FRT usa “hot-start”, que reduz substancialmente a frequência de reações não específicas. “Hot-start” é garantido por separação de nucleótidos e taq polimerase, usando polimerase modificada quimicamente (TaqF). A polimerase modificada quimicamente (TaqF) é ativada por aquecimento a 95° C durante 15 min.

3. RESULTADOS E ANÁLISE

Os dados usados neste estudo foram analisados com recurso ao *software* SPSS Statistics 21. O tipo de análise efetuada será descrito em cada um dos sub pontos deste capítulo.

3.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA E DESCRITIVA

Serão avaliadas de forma independente cada uma das variáveis que se considerou relevantes para o estudo.

3.1.1 Caracterização da população em estudo

A amostra é constituída por 16 020 utentes, dos quais 15 235 são mulheres (95.1%) e 785 são homens (4.9%). As idades encontram-se compreendidas entre os 10 e os 94 anos, sendo a média de idades de 34.89 anos e o desvio padrão de 11.24 anos. O intervalo de confiança a 95% para o valor médio da idade é]34.72; 35.07[. Como se pode observar no histograma de frequências a maioria dos utentes encontra-se na faixa etária reprodutiva.

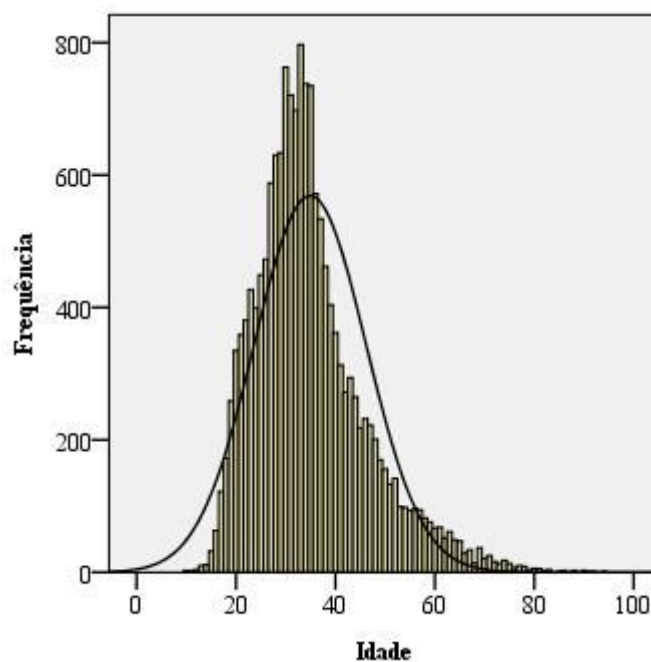


Figura 4 – Histograma de frequências da variável idade.

As medidas de tendência central não estão contidas no intervalo de confiança a 95% indicando assim que a amostra não apresenta uma distribuição normal para a variável em estudo.

Quando a variável é analisada em função do sexo também se observa uma distribuição assimétrica em ambos os casos, sendo no entanto, mais acentuada para o sexo feminino.

3.1.2 Avaliação do número de análises realizadas

A amostra constituída por 16 020 utentes resultou num pedido total de 25 685 análises, com a seguinte distribuição:

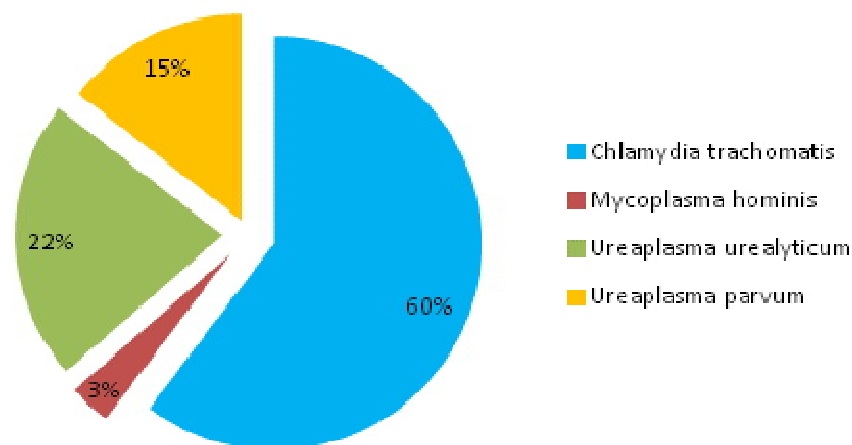


Figura 5 – Distribuição dos pedidos de análises.

Como se pode observar na figura 5 o maior número de análises, perfazendo um total de 15 491 pedidos, 60%, é para *Chlamydia trachomatis* dado ser a DST mais prevalente na atualidade. Com 22% dos pedidos encontra-se o *Ureaplasma urealyticum*.

Dada a constituição da amostra em estudo, maioritariamente feminina, é de suma importância fazer a análise destes pedidos em função do género para verificar se existem diferenças significativas em termos de expressão dentro de cada uma das variáveis. Assim, na tabela seguinte encontra-se a distribuição das análises por géneros.

Tabela 1 – Pedidos de análise distribuídos em função do género.

Tipo de análise	Nº análises		
	Masculino	Feminino	Total
<i>Chlamydia trachomatis</i>	727	14 764	15 491
<i>Mycoplasma hominis</i>	56	788	844
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	225	5 401	5 626
<i>Ureaplasma parvum</i>	168	3 556	3 724
Total	1 176	24 509	25 685

Os pedidos de análises realizadas por utentes do sexo masculino representam apenas 4.6% do pedido total de análises. Aproximadamente 62% destes pedidos é para *Chlamydia trachomatis* enquanto que o *Ureaplasma urealyticum*, é o segundo mais pedido com 19%. Quando se analisa a distribuição dos pedidos pelo sexo feminino, verifica-se que a ordem se mantém, a *Chlamydia trachomatis* representa 60% dos pedidos e o *Ureaplasma urealyticum* sobe para os 22%. Conclui-se assim que a distribuição dos pedidos é muito semelhante entre géneros.

3.1.3 *Chlamydia trachomatis*

Os pedidos de análise para *Chlamydia trachomatis* representam 60% do total dos pedidos de análise dos utentes em estudo. A colheita é um dos fatores a ter em conta neste estudo e os dados serão analisados em função desta variável bem como da variável género.

A maioria das amostras em estudo corresponde a colheitas de exsudado vaginal, cerca de 71.2%, não tendo expressão neste conjunto os pedidos de exsudado retal e de esperma, cada um deles com um único pedido.

Na tabela seguinte encontram-se os pedidos por amostra e a respetiva percentagem no contexto global.

Tabela 2 – Pedidos de análise para *Chlamydia trachomatis*.

Produto	Nº análises	%
Urina 1º jato (URI)	1 098	6.9
Exsudado uretral (URT)	1 014	6.3
Exsudado vaginal (VAG)	11 399	71.2
Exsudado endocolo (CEE)	1 978	12.3
Exsudado retal (RET)	1	0.0
Esperma (ESP)	1	0.0
TOTAL 15 491	• Positivos – 625 (4%) • Negativos – 14 866 (96%)	

Tendo em conta a distribuição da amostra por géneros apresentada no ponto anterior e dado que se observou a existência de uma diferença significativa entre os positivos vs negativos em função do género, os dados em estudo serão também explorados e apresentados em função do género.

Tabela 3 – Análises para *Chlamydia trachomatis* em função do género.

Produto	Masculino			Feminino		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
URI	273 (90.7%)	28 (9.3%)	301	762 (95.6%)	35 (4.4%)	797
URT	380 (89.6%)	44 (10.4%)	424	565 (95.8%)	25 (4.2%)	590
VAG	—	—	—	10 975 (96.3%)	424 (3.7%)	11 399
CEE	—	—	—	1 909 (96.5%)	69 (3.5%)	1 978
RET	1 (100%)	0 (0%)	1	—	—	—
ESP	1 (100%)	0 (0%)	1	—	—	—

Para a maioria das análises realizadas em mulheres foram pedidas amostras de exsudado vaginal, 77.2%, seguido do exsudado do endocolo com 13.4%. Esta observação era de certa forma expectável dado que a maioria destas análises é prescrita nas consultas de ginecologia. Já no caso dos homens as análises distribuem-se sem uma diferença tão significativa entre as amostras de urina e de exsudado uretral. De salientar ainda que são destas últimas amostras as análises que devolvem maior percentagem de positivos independentemente do sexo.

Dos resultados apresentados na tabela 3 destaca-se a diferença entre a percentagem de positivos obtida em função do género, apresentado o sexo masculino maior percentagem de positivos, cerca de 10%, comparado com a percentagem de positivos obtida no sexo feminino, cerca de 4%.

3.1.4 *Mycoplasma hominis*

Os pedidos de análise para *Mycoplasma hominis* representam apenas 3.3% do total dos pedidos de análise dos pacientes em estudo. A maioria das amostras é mais uma vez de exsudado vaginal, 65.2% e não existiu nenhum pedido para exsudado retal. Na tabela 4 encontram-se os pedidos por amostra e a respetiva percentagem no contexto global. A percentagem de resultados negativos foi de 96.1%.

Tabela 4 – Pedidos de análise para *Mycoplasma hominis*.

Produto	Nº análises	%
Urina 1º jato (URI)	28	3.3
Exsudado uretral (URT)	65	7.7
Exsudado vaginal (VAG)	550	65.2
Exsudado endocolo (CEE)	200	23.7
Esperma (ESP)	1	0.1
TOTAL 844	• Positivos – 33 (3.9%) • Negativos – 811 (96.1%)	

Dos 844 pedidos de análise apenas 55 foram realizados em amostras masculinas (6.5%) e em nenhum caso se obteve resultado positivo como seria de esperar já que o

MH é sobretudo um colonizador na mulher. Das 789 análises de amostras femininas apenas 33 apresentaram resultado positivo (4.2%). O maior número de pedidos foi no exsudado vaginal, seguido do endocolo, no entanto a maior percentagem de positivos regista-se na urina e no endocolo. Os resultados podem ser consultados na tabela 5.

Tabela 5 – Análises para *Mycoplasma hominis* em função do género

Produto	Masculino			Feminino		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
URI	8 (100%)	0 (0%)	8	19 (95.0%)	1 (5.0%)	20
URT	47 (100%)	0 (0%)	47	18 (100%)	0 (0%)	18
VAG	—	—	—	530 (96.4%)	20 (3.6%)	550
CEE	—	—	—	188 (94.0%)	12 (6.0%)	200
ESP	1 (100%)	0 (0%)	1	—	—	—

3.1.5 *Ureaplasma urealyticum*

Foram registados 5 226 pedidos de análise para *Ureaplasma urealyticum* representando 21.9% da totalidade em estudo. À semelhança do que já se havia observado com as outras análises também aqui a maioria das amostras é de exsudado vaginal, 82.5%. No entanto e ao contrário do registado até aqui, esta análise devolve globalmente cerca de 11% de positivos. Os resultados globais e diferenciados por género poderão ser consultados nas tabelas 6 e 7 respetivamente.

Para a maioria das análises realizadas em mulheres foram pedidas amostras de exsudado vaginal, seguido do exsudado do endocolo. Estas amostras são as que apresentam maior percentagem de positivos. Regista-se ainda maior percentagem de positivos no sexo feminino do que no sexo masculino.

Tabela 6 – Pedidos de análise para *Ureaplasma urealyticum*

Produto	Nº análises	%
Urina 1º jato (URI)	66	1.2
Exsudado uretral (URT)	217	3.8
Exsudado vaginal (VAG)	4 641	82.5
Exsudado endocolo (CEE)	695	12.4
Exsudado retal (RET)	1	0.0
Exsudado vulvar (VUL)	1	0.0
Esperma (ESP)	5	0.1
TOTAL	5 626	<ul style="list-style-type: none"> • Positivos – 624 (11.1%) • Negativos – 5 002 (88.9%)

Tabela 7 – Análises para *Ureaplasma urealyticum* em função do género

Produto	Masculino			Feminino		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
URI	34 (97.1%)	1 (2.9%)	35	31 (100%)	0 (0%)	31
URT	171 (92.4%)	14 (7.6%)	185	30 (93.8%)	2 (6.2%)	32
VAG	—	—	—	4 111 (88.6%)	530 (11.4%)	4 641
CEE	—	—	—	619 (89.1%)	76 (10.9%)	695
RET	—	—	—	1 (100%)	0 (0%)	1
VUL	—	—	—	1 (100%)	0 (0%)	1
ESP	4 (100%)	1 (0%)	5	—	—	—

3.1.6 *Ureaplasma parvum*

Para o *Ureaplasma parvum* foram registados 3 724 pedidos de análise, resultando num total de 34.4% de positivos. De referir ainda, que mais uma vez a amostra mais pedida foi a de exsudado vaginal. O exsudado uretral é amostra que apresenta maior percentagem de resultados positivos. Á semelhança do já obtido para o UU, observa-se maior percentagem de positivos no sexo feminino, pois os *Ureaplasmas* são colonizadores frequentes do trato vaginal e urinário, estando também de acordo com as estatísticas de incidência da era molecular.

Tabela 8 – Pedidos de análise para *Ureaplasma parvum*

Produto	Nº análises	%
Urina 1º jato (URI)	61	1.6
Exsudado uretral (URT)	153	4.1
Exsudado vaginal (VAG)	3 032	81.4
Exsudado endocolo (CEE)	477	12.8
Esperma (ESP)	1	0.1
TOTAL 3 724	<ul style="list-style-type: none"> • Positivos – 1 280 (34.4%) • Negativos – 2 444 (65.6%) 	

Tabela 9 – Análises para *Ureaplasma parvum* em função do género

Produto	Masculino			Feminino		
	Negativo	Positivo	Total	Negativo	Positivo	Total
URI	30 (90.9%)	3 (9.1%)	33	20 (71.4%)	8 (28.6%)	28
URT	108 (80.6%)	26 (19.4%)	134	6 (31.6%)	13 (68.4%)	19
VAG	—	—	—	1 940 (64.0%)	1 092 (36.0%)	3 032
CEE	—	—	—	339 (71.1%)	138 (28.9%)	477
ESP	1 (100%)	0 (0%)	1	—	—	—

3.2 AVALIAÇÃO DO PEDIDO DE ANÁLISES EM FUNÇÃO DA FAIXA ETÁRIA

Dado que as principais repercussões destas patologias recaem sobre questões de fertilidade/reprodutibilidade e se manifestam sobretudo em pessoas sexualmente ativas, revelou-se necessário separar a amostra por faixas etárias. Assim, a amostra em estudo foi dividida em seis faixas etárias, designadas de 1 a 6 respeitando os seguintes intervalos de idade: 1 – 10 aos 18 anos; 2 – 19 aos 26 anos; 3 – 27 aos 34 anos; 4 – 35 aos 42 anos; 5 – 43 aos 50 anos; 6 – 51 aos 94 anos.

Tabela 10 – Análises requisitadas em função da faixa etária.

Faixa etária (anos)	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Ureaplasma parvum</i>
10 – 18	425	7	104	62
19 – 26	3 049	119	932	616
27 – 34	5 455	275	1 880	1 221
35 – 42	3 531	219	1 423	943
43 – 50	1 644	127	715	501
51 – 94	1 387	97	572	381
Total	15 491	844	5 626	3 724

Como se pode observar na tabela 10 a faixa etária com maior pedido de análises é a 3 que diz respeito aos utentes entre os 27 e os 34 anos. Esta faixa etária é sexualmente ativa e nesta gama de idades as utentes procuram consultas de ginecologia não apenas como consultas de rotina mas também como consultas de planeamento familiar, sendo provavelmente este facto que está a contribuir para o aumento de pedidos de análise face às outras faixas etárias. Há que considerar também que em Portugal é cada vez maior o número de mulheres que engravidam em idades mais avançadas, e dado que o rastreio da *Chlamydia* e dos *Micoplasmas* se efetua também durante a gravidez, é natural que este fator contribua para fazer aumentar o pedido de análises em idades compreendidas entre os 30 e os 40 anos (faixas etárias 3 e 4).

Em anexo encontram-se as tabelas com os diferentes tipos de análise e os resultados obtidos em cada conjunto. No entanto, para facilitar a compreensão e análise deste conjunto de dados optou-se por apresentar uma tabela onde se reúnem as diferentes

análises e os resultados obtidos. Como se pode constatar da consulta da tabela o comportamento positivo vs negativo está intimamente relacionado com o tipo de análise. Já havia sido referido em pontos anteriores que a análise com mais resultados positivos é o *Ureaplasma parvum* (34.4%) seguido do *Ureaplasma urealyticum* (11.1%). Torna-se agora interessante observar este comportamento mas em função da respetiva faixa etária.

Tabela 11 – Percentagem de resultados positivos e negativos obtidos para cada análise requisitada em função da faixa etária

Faixa etária	<i>Chlamydia trachomatis</i>		<i>Mycoplasma hominis</i>		<i>Ureaplasma urealyticum</i>		<i>Ureaplasma parvum</i>	
	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
(anos)								
10 – 18	10.4	89.6	0	100	19.2	80.8	48.4	51.6
19 – 26	9.0	91.0	3	97	15.2	84.8	38.6	61.4
27 – 34	3.7	96.3	3	97	10.9	89.1	36.7	63.3
35 – 42	2.1	97.9	6	94	10.0	90.0	34.5	65.5
43 – 50	1.5	98.5	4	96	9.4	90.6	32.7	67.3
51 – 94	0.4	99.6	2	98	8.4	91.6	19.7	80.3

A análise da tabela evidencia uma diferença significativa entre as diferentes faixas etárias. Como se pode observar as faixas etárias que agrupam os utentes mais jovens são as que apresentam uma maior taxa de positivos em três das quatro análises pedidas. Esta faixa etária corresponde à idade de início das relações sexuais, existindo uma maior possibilidade de múltiplos parceiros e isso corresponderá também a uma maior probabilidade de contrair uma DST. Em simultâneo não será de rejeitar a hipótese de nestas faixas etárias a procura de consultas estar de facto relacionada com a sintomatologia associada a estas infeções. De realçar ainda que o *Mycoplasma hominis* apresenta a maior taxa de positivos para os utentes entre os 35 e os 42 anos.

Tendo em conta os dados obtidos na tabela anterior optou-se por realizar o teste do Qui-Quadrado para verificar se a diferença entre as faixas etárias é estatisticamente significativa. Contudo e dada a ocorrência de frequências inferiores a 5 em 50% das células para a análise do *Mycoplasma hominis*, situação essa que compromete o uso

do teste, entendeu-se que seria, do ponto de vista da análise, mais prudente redefinir as faixas etárias em apenas 3 grupos. Assim, foram consideradas (i) faixa etária 1 que compreende todos os utentes até aos 30 anos; (ii) faixa etária 2 que engloba todos os utentes entre os 31 e os 45 anos e (iii) faixa etária 3 que diz respeito aos restantes utentes com idades superiores a 45 anos. Esta opção recai sobretudo na possibilidade de analisar a amostra em função dos utentes que se encontram numa faixa etária reprodutiva e os que já não fazem parte desse grupo.

Dado o elevado número de *outputs* produzidos optou-se por apresentar os resultados obtidos por extenso, apresentando-os separados por cada tipo de infeção. Assim, para a infeção por *Mycoplasma hominis* constata-se que entre as faixas etárias 1 e 2, ambas em idade reprodutiva, não existe diferença significativa. O mesmo comportamento é observado quando se compara a faixa etária 2 com a 3 e a 1 com a 3. Em todos os conjuntos foi obtido um *p-value* > 0.05.

Quando se avalia o comportamento das diferentes faixas etárias para a infeção por *Ureaplasma urealyticum* verifica-se que a faixa 1 apresenta uma maior percentagem de positivos (13,5%) que a faixa etária 2 (10%) e o valor de significância obtido é de 0.001 o que indica haver diferenças significativas entre as faixas etárias em estudo. O mesmo comportamento é registado quando se compara a faixa etária 1 com a 3 obtendo-se neste caso um *p-value* < 0.001. Contudo na análise comparativa das faixas etárias 2 e 3 chega-se a um *p-value* = 0.168 indicando assim não existirem diferenças significativas entre estes grupos etários.

Na análise do comportamento para a infeção por *Ureaplasma parvum* observa-se que, independentemente das faixas etárias em comparação, o resultado da aplicação do teste Qui-Quadrado é semelhante em todos, concluindo-se assim que existem diferenças significativas entre estas três faixas etárias (1-2 e 1-3, *p-value* < 0.001; 1-2, *p-value* = 0.008).

No estudo comparativo para a infeção por *Chlamydia trachomatis* optou-se por fazer a análise usando também a informação do tipo de recolha. A observação dos *outputs* permitiu validar toda a informação já apresentada e que de facto quando se analisa em função da faixa etária se conclui que a partir de uma determinada idade (43 anos) o número de análises com resultados positivos é muito baixo. Assim, para a *Chlamydia trachomatis* apenas não apresentam diferenças significativas os resultados obtidos com as análises cuja recolha foi de exsudado do endocolo, faixas etárias 2-3 com *p-value* = 0.077, e de exsudado retal, faixas

etárias 1-2 com *p-value* = 0.106. Todas as outras comparações obtiveram valores de significância inferiores a 0.05.

3.3 PRESENÇA SIMULTÂNEA DAS DIVERSAS BACTÉRIAS

A presença de mais do que uma agente é frequente e por isso optou-se por verificar se a amostra em estudo seguia esse padrão. Apesar de todas as bactérias em causa poderem ter transmissão sexual, apenas a CT é potencialmente patogénica à priori, os restantes podem ser apenas colonizadores. Fez-se então um cruzamento da CT com as outras 3 bactérias, para avaliar a presença de mais do que um agente. Dos 25 685 pedidos de análises, 8 094 (31,5%) foram pedidos para mais do que um agente bacteriano. Neste estudo apenas cerca de 1% apresenta resultados positivos para mais do que uma bactéria, não tendo assim expressividade. No entanto a colonização CT/UP é a que apresenta maior número de casos como seria expectável.

Tabela 12 – Cruzamento de CT com as restantes bactérias

		<i>Mycoplasma hominis</i>		<i>Ureaplasma urealyticum</i>		<i>Ureaplasma parvum</i>	
		negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo
<i>Chlamydia trachomatis</i>	negativo	532	13	3 924	110	1 896	37
	positivo	21	2	492	15	1 003	49

3.4 AVALIAÇÃO DA NECESSIDADE DE APLICAÇÃO DE TERAPÊUTICA

A administração de forma indevida de antibióticos resulta num aumento da resistência aos mesmos o que se tem vindo a tornar num grave problema de saúde pública. Apesar do problema ainda subsistir a introdução no mercado das técnicas moleculares que permitem separar o *Ureaplasma spp* em *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum* permitiu uma nova abordagem terapêutica contribuindo assim para a diminuição da prescrição de antibióticos.

A avaliação dos resultados das duas análises, apresentados na tabela 13, mostra que se não existisse a separação entre UU e UP, e apenas fosse considerado *Ureaplasma spp.* dos 3 724 utentes 1 444 realizariam terapêutica com antibiótico. No entanto, apenas 213 utentes necessitam efetivamente de terapêutica antibacteriana. Estes resultados evidenciam claramente um avanço significativo em termos de terapêutica.

Tabela 13 – *Ureaplasma parvum* vs *Ureaplasma urealyticum*

		<i>Ureaplasma urealyticum</i>		Total
		Negativo	Positivo	
<i>Ureaplasma parvum</i>	Negativo	2280	164	2444
	Positivo	1231	49	1280
Total		3511	213	3724

4. DISCUSSÃO

As infeções genitais podem ser consideradas como uma das principais causas de infertilidade, uma vez que provocam sequelas transitórias ou permanentes nos órgãos relacionados à reprodução, tanto masculinos como femininos. A presença de uma DST é igualmente preocupante durante a gestação em função dos possíveis efeitos adversos sobre o binómio mãe-feto bem como durante o parto. De referir ainda que as DST apresentam-se sob diversas manifestações clínicas cujas consequências têm um impacto significativo na sociedade.

O rastreio de *Chlamydia e Mycoplasma* permite: (i) diminuir o número de mulheres infetadas em idade fértil; (ii) diminuir o número de infeções progressivas a partir de idades precoces; (iii) diminuir o número de infeções profundas como salpingites e uretrites; (iv) elevar o número de utentes diagnosticados e que passam a fazer terapêutica. Se o rastreio for bem-sucedido contribuirá para a diminuição do número de casais inférteis e também terá um papel importante na prevenção de outras infeções que se podem vir a desenrolar e evoluir para tumores.

Este estudo incidiu sobre uma amostra com idade média dos utentes de aproximadamente 34 anos, situando-se a faixa etária com maior pedido de análises entre os 27 e os 34 anos, uma faixa etária sexualmente ativa, em idade reprodutiva e também com uma forte probabilidade de contrair DST. Esta faixa etária corresponde a utentes que procuram consultas de ginecologia por diversos motivos, consulta de rotina, consulta de planeamento familiar, ou ainda por se encontrarem num período de gestação, razões estas que contribuem para aumentar este número, estando em concordância com o descrito na literatura no que diz respeito à importância destas bactérias em questões reprodutivas. Assim, será também esta a razão que justifica o tipo de colheita mais usado, o exsudado vaginal.

Neste estudo constatou-se que das 25 685 análises efetuadas, apenas 4.6% foram de amostras masculinas, visto que a maioria dos homens só fazem consulta se apresentarem sintomatologia. Pelo contrário, às mulheres são muitas vezes prescritas análises mesmo quando estas não apresentam sintomas, pois recorrem com mais frequência a consultas de rotina/planeamento familiar. A prescrição na ausência de sintomatologia está relacionada com o facto de as DST serem doenças “silenciosas”, sendo as análises prescritas por questões de segurança, permitindo assim fazer um

rastreio à doença. Existe ainda outro facto que merece relevo que se prende com a deteção das DST durante a gravidez, isto porque, as alterações fisiológicas da gravidez podem dificultar o diagnóstico da utente, assim como a presença do feto pode limitar o tratamento. Assim, é natural que durante o período de gestação quando a mulher mais procura assistência médica, lhe seja prescrito este tipo de análises. Esta situação também contribui para o aumento da discrepância entre sexos no que diz respeito ao número de análises realizadas e tendo em conta os dados, era expectável que a colheita efetuada no exsudado vaginal fosse a mais comum e de facto assim acontece. Este tipo de colheita é a que tem maior prevalência no presente estudo.

Das análises em estudo a *Chlamydia trachomatis* é a análise com maior número de pedidos tanto no sexo feminino como no masculino, por ser a DST mais prevalente na atualidade. No período a que corresponde este estudo, ocorreram no sexo feminino cerca de 4% de novos casos e no género masculino 10%, outros estudos referem percentagens semelhantes.^{16,19} Estes números podem gerar alguma preocupação dado que em Portugal a percentagem de casais inférteis é elevada. As colheitas de urina e exsudado uretral são os produtos que apresentam maior positividade para ambos os sexos. No caso dos homens a urina é o material biológico de escolha para o diagnóstico de *Chlamydia trachomatis* por PCR, por ser de fácil colheita. No entanto, na amostra em estudo observa-se existir maior número de pedidos para exsudado uretral devido muito provavelmente ao facto de existir sintomatologia localizada. Contudo, é de salientar que na amostra em estudo a colheita com maior percentagem é a de exsudado vaginal pelas razões já expostas.

As amostras de urina recolhidas de utentes do sexo feminino apresentaram duas vezes mais inibidores do que as do sexo masculino, porém, como 10 a 23% das mulheres apresentam apenas infeção uretral é aconselhável a colheita de zaragatoa endocervical ou vaginal em conjunto com a colheita de urina, para aumentar a probabilidade de determinar a presença da infeção, explicando-se assim o facto de haver mais do que um produto pedido para o mesmo utente.⁸⁷ Acredita-se que a inibição parcial ou total da PCR em mulheres possa ocorrer devido à hormona beta-gonadotrofina coriônica (β -HCG), uso de contraceptivos, uso de gel de lubrificação na aplicação do espécuro, presença de metais em dispositivos intra-uterinos (DIU) e cristais que contenham catiões divalentes, particularmente iões de magnésio que

apresentam efeito inibidor significativo na atividade da Taq polimerase.⁸⁸ Os inibidores de PCR estão presentes predominantemente em urina e na camada superficial da mucosa uretral de mulheres jovens. Porém, inibição é detetada tanto em amostras urinárias de mulheres como de homens, em exsudados uretrais masculinos e femininos e também em exsudados vaginais e endocervicais.⁸⁹⁻⁹² A presença de inibidores pode ser contornada efetuando o congelamento e descongelamento das amostras que pode destruir moléculas inibitórias lábeis ou libertar alvos adicionais de moléculas de DNA rompendo as células bacterianas mais eficazmente, assim como pode atuar diretamente em proteínas induzindo uma mudança conformacional e subsequente perda da atividade inibitória. O aquecimento das amostras entre 95°C e 100°C durante 10 minutos tem sido referido com relativa eficácia, para inativação de inibidores.⁹³⁻⁹⁹ Desta forma poder-se-á contribuir para um melhor diagnóstico desta DST. De salientar ainda que, apesar das colheitas de urina apresentarem uma percentagem de positivos mais elevada, esta análise não deve ser utilizada sozinha para o diagnóstico.^{88,100,101}

Para além da infeção por *Chlamydia trachomatis*, as infeções por *Mycoplasmas* e *Ureaplasmas*, apesar de menos referenciadas na literatura, também podem causar efeitos nocivos à fertilidade e ao sistema urogenital. Dados da literatura fundamentam o impacto negativo dessas infeções sobre as variáveis ligadas à reprodução, mas nota-se grande variação na incidência destas alterações.

Neste estudo a baixa percentagem de *Mycoplasma hominis* está em concordância com a literatura.^{17,18} O *Mycoplasma hominis* é frequentemente isolado do trato urogenital e do trato respiratório de pessoas saudáveis e assintomáticas, sendo por essa razão a análise menos prescrita. O facto de ser mais prescrita em mulheres do que em homens e neste caso ser predominante o pedido no exsudado vaginal acompanha o já descrito para a *Chlamydia trachomatis*. O facto de não existir nenhum caso positivo em homens é devido a este ser sobretudo um colonizador na mulher.

Os resultados para *Ureaplasma Urealyticum* (11%) acompanham o descrito na literatura que apresentam percentagens equivalentes.¹⁶⁻¹⁹

Em relação ao *Ureaplasma parvum* (15% das análises prescritas) esta é a análise que apresenta maior percentagem de positivos (34%) estando este facto associado à não

patogenicidade, por fazer parte da flora vaginal normal e estando também associado a infeções do trato urinário, sendo portanto a espécie mais comumente isolada em amostras clínicas, estando de acordo com o descrito na literatura.^{16,19} Cerca de 70% dos pedidos totais para os *Ureaplasmas* é feito em conjunto para os *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, dos quais apenas fazem terapêutica os utentes que apresentam resultados positivos para UU ou UU+UP, o que na amostra em estudo corresponde apenas a 14% do total de positivos. O facto de haver distinção através dos métodos moleculares entre UU e UP faz com que a antibioterapia apenas seja administrada no caso de a infeção ser causada por UU, que é a forma patogénica. Antes de existir esta distinção todos os casos eram referenciados para administração de antibioterapia. No caso do UP não se procede a antibioterapia por este não ser considerado patogénico. Este facto contribuiu para o uso racional de antibióticos, assim como para a diminuição de resistência a antibióticos, e ainda se observa uma redução de custos associada à realização de menos terapêutica. De salientar ainda que para estas infeções a maior taxa de positivos localiza-se essencialmente nas faixas etárias 1 e 2 que englobam os utentes até aos 26 anos. Esta faixa etária corresponde à idade de início das relações sexuais, existindo uma maior possibilidade de múltiplos parceiros e isso corresponderá também a uma maior probabilidade de contrair uma DST.

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados ao longo deste trabalho, sobre a incidência de bactérias associadas a doenças sexualmente transmissíveis numa vasta gama de idades, permitiram abordar algumas das questões mais críticas relacionadas com as questões de infertilidade e dos efeitos adversos sobre o binómio mãe-feto.

Uma das situações mais exploradas prende-se com o número de novos casos que surge em cada um dos géneros. Se por um lado o género masculino apresenta-se com uma maior taxa que pode ser justificada pela procura devido à sintomatologia, por outro pode-se usar o rastreio e a prevenção para justificar a menor taxa apresentada pelo género feminino. De salientar, contudo, que o rastreio tem neste tipo de bactérias um papel fundamental no que respeita à sociedade. O número cada vez menor de nascimentos, o número cada vez maior de casais inférteis e o número cada vez maior de bebés que apresentam problemas à nascença relacionados com estas infeções justifica o elevado número de análises realizadas nas faixas etárias de maior risco.

Este estudo revelou ainda que o tipo de colheita pode influenciar os resultados obtidos e que é aconselhável usar mais do que um tipo de colheita para garantir um melhor diagnóstico.

O uso de métodos moleculares que permitem a distinção entre os *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, contribui para o uso racional de antibióticos, diminuindo assim a resistência aos mesmos e viabiliza simultaneamente uma redução de custos associada à realização de menos terapêutica.

Neste estudo abrangente não só em termos de número de análises processadas mas também na faixa etária (10 – 94 anos) foi possível concluir que, e de acordo com o expectável, as faixas etárias mais jovens e as faixas etárias correspondentes a utentes em idade reprodutiva, foram as que apresentaram uma maior incidência de positivos. Justifica-se assim uma intervenção continuada ao nível da prevenção, realizando-se rastreios e sensibilizando a população para os riscos inerentes à contração deste tipo de infeções.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Infertility, A tabulation of available data on prevalence of primary and secondary infertility, Programme on Maternal and Child Health and Family Planning. (1991) *World Health Organization, Division of Family Health*, Geneva, Suíça.
2. Paavonen, J., Eggert-Kruse, W. (1999) “Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction”, *Human Reproduction*, 5(5) pp. 433-47.
3. Morales, P., Reyes, P., Vargas, M., Rios, M., Imarai, M., Cardenas, H. et al. (2006) “Infection of human fallopian tube epithelial cells with *Neisseria gonorrhoeae* protects cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis”, *Infect Immun*, 74(6) pp. 3643-50.
4. Sexually transmitted infections (2013) World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/en/>
5. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) (1996) “Infertility revisited: The state of the art today and tomorrow”. Capri Workshop. April 17, pp. 1779-1807.
6. Ravel, J., Gajer, P., Abdob, Z., Schneider, G.M., Koeniga, S.S.K., McCullea, S.L. et al. (2011) “Vaginal microbiome of reproductive-age women”, *PNAS* March, 108(1) pp. 4680–7.
7. Casari, E., Ferrario, A., Morengi, E., Montanelli, A. (2010) “*Gardnerella*, *Trichomonas vaginalis*, *Candida*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in the genital discharge of symptomatic fertile and asymptomatic infertile women” *New Microbiologia*, 33, pp. 69-76.
8. Boskey, E.R., Telsch, K.M., Whaley, K.J., Moench, T.R., Cone, R.A. (1999) “Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification”, *Infect Immun*, 67(10), pp. 5170-5.
9. Wiggins, R., Hicks, S.J., Soothill, P.W., Millar, M.R., Corfield, A.P. (2001) “Mucinases and sialidases: their role in the pathogenesis of sexually

transmitted infections in the female genital tract”, *Sex Transm Inf*, 77, pp. 402–8.

10. Imudia, A.N., Detti, L., Puscheck, E.E., Yelian, F.D., Diamond, M.P. (2008) “The prevalence of ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae infections, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation”, *J Assist Reprod Genet*, 25, pp. 43–6.
11. Rodríguez, R., Hernández, R., Fuster, F., Torres, A., Prieto, P., Alberto, J. (2001) “Infección genital y esterilidad”, *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 19, pp. 261-6.
12. Gupta, A., Gupta, A., Gupta, S., Mittal, A., Chandra, P., Gill, A.K. (2009) “Correlation of mycoplasma with unexplained infertility”, *Arch Gynecol Obstet*, 280, pp. 981–5.
13. Gump, D.W., Gibson, M., Ashikaga, T. (1984) “Lack of association between genital mycoplasmas and infertility”, *N Engl J Med*, 310(15), pp. 937–41.
14. Samra, Z., Soffer, Y., Pansky, M. (1994) “Prevalence of genital chlamydia and mycoplasma infection in couples attending a male infertility clinic”, *European Journal of Epidemiology*, 10, pp. 69-73.
15. Cottell, E., McMorro, J., Lennon, B., Fawcys, M., Cafferkey, M., Harrison, R.F. (1996) “Microbial contamination in an in vitro fertilization-embryo transfer system”, *Fertil Steril*, Nov, 66(5), pp. 776-80.
16. Carne, C.A., Gibbs, J., Delaney, A., Sonnex, C., Verlander, N.Q., Smielewska, A., Skeggs, E., Bentley, N., Jalal, H. (2013) “Prevalence, clinical features and quantification of genital non-viral infections”. *Int J STD AIDS*, 24 pp. 273-277.
17. Ouzounova-Raykova, V.V., Markovska, R., Mizgova, G., Mitov, I.G. (2011) “Detection of the sexually transmissible genital mycoplasmas by polymerase chain reaction in women” *Sex Health*. 8 pp. 445-6.

18. Witkin, S.S., Kligman, I., Grifo, J.A., Rosenwaks, Z. (1995) "Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis detected by the polymerase chain reaction in the cervixes of women undergoing in vitro fertilization: prevalence and consequences". *J Assist Reprod Genet.* 12 pp. 610-4.
19. Jalal, H., Delaney, A., Bentley, N., Sonnex, C., Carne, C.A. (2013) "Molecular epidemiology of selected sexually transmitted infections." *Int J Mol Epidemiol Genet.* 4 pp. 167-74.
20. Fernández-Benítez, C., Mejuto-López, P., Otero-Guerra, L., Margolles-Martins, M.J., Suárez-Leiva, P., Vazquez, F. (2013) "Prevalence of genital Chlamydia trachomatis infection among young men and women in Spain." *BMC Infect Dis.* 13 pp. 388.
21. Ferreira, W. C., Sousa J.C. (2000) "Microbiologia", pp. 193-197, Lidel, Lisboa.
22. Naaheimo, H., Kosma, P., Brade L., Brade, H., Peters, I. (1999) "Mapping the binding of synthetic disaccharides representing epitopes of Chlamydial lipopolysaccharide to antibodies with NMR". *Biochem*, 89, pp. 3240-3248.
23. Mahony, J. B., Coombes, B. K., Chernsky, M.A. (2003) "Chlamydia and Chlamydothila" in *Manual of clinical Microbiology*, 8.^a ed., pp. 991-1004, ASM press, Washington, D.C., USA.
24. Corsaro, D., Valassina, M., Venditti, D. (2003) "Increasing diversity within Chlamydiae", *Critical Reviews in Microbiology*, pp. 37-78.
25. Murray et al. (2007) "*Manual of clinical Microbiology*", 9.^a ed., pág. 1023, ASM Press, Washington, USA.
26. Schachter, J. (1999) "Biology of Chlamydia trachomatis", in Holmes KK et al. *Sexually transmitted diseases*, 3.^a ed, McGrawHill, New York, USA.
27. Cervantes, G. E. (2009) "Infecciones causadas por Chlamydia trachomatis", Monografía, Dpto. Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México.

28. Frost, E., Delandes, S., Veileux, S., Boirgaux-Ranvisy, D. (1991) "Typing *Chlamydia trachomatis* by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein", *J Infect Dis*, 172, pp. 1013-1022.
29. Gerard, H.C., Freise, J., Wang, Z. (2002) "Chlamydia trachomatis genes whose products are related to energy metabolism are expressed differentially in active vs persistent infection". *Microbes Infection*: 4; pp. 13-22.
30. Raulton, J. (1998) "Localization of *Chlamydia trachomatis* heat shock protein 60 and 70 during infection of a human endometrial epithelial cell line in vitro", *Infect Immun*, 66, pp. 2323-2329.
31. Wyrick, P.B. (1998) "Cell biology of chlamydial infections" *Proceedings of 9th. International Chlamydia Symposium*, San Francisco, pp. 69-78.
32. Pádua, M.M. (2009) "Patologia Clínica para Técnicos" pp. 384, Lusociência, Loures.
33. Greenwood et al. (2002) "*Medical Microbiology*", 16.^a ed., Fig. 39-1, Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland.
34. Stephens, R., Kalman, S., Lamel, C., Fan, J., Marathe, R. (1998) "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*", *Science*; 282, pp. 754-759.
35. Washington, W.Jr., Allen, S., Janda, W., Koneman, E. (2005) "Koneman's *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*", 6 th edition. Lippincott Williams & Wilkins, PA, USA.
36. Watson, M.W., Lambden, P.R., Clarke, N. (1991) "Genetic diversity and identification of human infection by amplification of the Chlamydial 60 kilodalton cysteine rich outer membrane protein gene", *J Clin Microbiol*, 29, pp. 1188-1193.
37. Weström, L. V. (1999) "Combatendo a chlamídia", *ORGYN*, v. 1, n. 4, pp. 3-6.

38. Di Felice, V., David, S., Cappello, F., Farina, F., Zummo, G. (2005) "Is Chlamydia heat shock protein 60 a risk factor for oncogenesis?" *Cell Mol Life Sci.*, 62, pp. 4-9.
39. Taylor, B.D., Haggerty, C.L. (2011) "Management of chlamydia trachomatis genital tract infection: screening and treatment challenges", *Infection and Drug Resistance*, 4, pp. 19-29.
40. Manavi, K. (2006) "A review on infection with Chlamydia trachomatis", *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, Elsevier, 20(6), pp. 941-51.
41. Sweet, R.L., Gibbs, R.S., (2002) "Chlamydial infections" In Sweet, R.L., Gibbs, R.S., editors. *Infectious diseases of the female genital tract*. 4.^a ed., pp. 57-100, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
42. Tadmor, O.P., Shaia, M., Rosenman, H., Livshin, Y., Chonkroun, C., Barr, I. et al. (1993) "Pregnancy outcome in serologically indicated active chlamydia trachomatis infection", *Isr J Med Sci*, 29, pp. 280-4.
43. Brunham, R.C., Laga, M., Simonsen, J.N., Cameron, D.W., Peeling, J.M., Pamba, H., Ndinta-Achola, J.O., Maitha, G., Plummer, F.A. (2000) "The prevalence of Chlamydia trachomatis infection among mothers of children with trachoma", *Am J Epidemiol*, v. 32, n. 5, pp. 946-952.
44. Schachter, J., Grossman, M., Sweet, R.L. (2004) "Prospective study of perinatal transmission of Chlamydia trachomatis", *JAMA*, v. 255, pp. 3374-3378.
45. Cunningham, K.A. & Beagley, K.W. (2008) "Male genital tract chlamydial infection: implications for pathology and infertility", *Biol. Reprod.*, 79, pp. 180-9.
46. Nelson, H.D., Helfand, M. (2001) "Screening for Chlamydial Infection", *Am J Prev Med*, v 20, pp. 95-107.
47. Flemin, D.T., Wasserheit, J.N. (1999) "From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of the other sexually

transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection”, *Sex Transm Infect*, v.75, pp. 3-17.

48. Murray et al. (2005) “*Medical Microbiology*”, 5.^a ed., pág. 467, Elsevier Mosby, PA, USA.
49. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., Pfaller, M. A. (2002) “*Medical Microbiology*”, 4.^a ed., Fig 44-3 p. 416, Mosby-Year Book, Missouri, USA.
50. Hamdad, F., Orfila, J., Boulanger, J.C., et al. (2004) “*Chlamydia trachomatis* urogenital infections in women.” Best diagnosis approaches. *Gynecol Obstet Fertil*. 32, pp. 1064-74.
51. Jackson, B. (2005) “Relative cost-effectiveness of different tests for *Chlamydia trachomatis*.” *Ann Intern Med*. 142 pp. 308-9.
52. Black, M.C. (1997) “Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections.” *Clin Microbiol Ver*. 10 pp. 160-84.
53. Forward, K.R. (2003) “The impact of switching to polymerase chain reaction for the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in women.” *Can J Public Health*. 94 pp. 229-32.
54. Gaydos, C.A., Quinn, T.C. (2005) “Urine nucleid acid amplification tests for the diagnosis of sexually transmitted infections in clinical practice.” *Curr Opin Infect Dis*. 18 pp. 55-66.
55. Kellogg, N.D., Baillargeon, J., Lukefahr, J.L. (2004) “Comparison of nucleid acid amplification tests and culture techniques in the detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in victims of suspected child sexual abuse. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 17 pp. 331-9.
56. Martin, D.H., Nsuami, M., Schachter, J., et al. (2004) “Use of multiple nucleic acid amplification tests to define the infected-patient “gold standard” in clinical trials of new diagnostic tests for *Chlamydia trachomatis* infections.” *J Clin Microbiol*. 42 pp. 4749-58.

57. George, J.A., Panchatcharam, T.S., Paramasivam, R. (2003) "Evaluation of diagnostic efficacy of PCR methods for *Chlamydia trachomatis* infection in genital and urine specimens of symptomatic men and women in India." *Jnp J Infect Dis.* 56 pp. 88-92.
58. Marazzo, J.M., Johnson, R.E., Green T.A. (2005) "Impact of patient characteristics on performance of nucleic acid amplification tests and DNA probe for detection of *Chlamydia trachomatis* in women with genital infections." *J Clin Microbiol.* 43 pp. 577-84.
59. Watson, E.J., Templeton, A., Russel, I. (2002) "The accuracy and efficacy of screening tests for *Chlamydia trachomatis*: a systematic review." *J Med Microbiol.* 51 pp.1021-31.
60. Workowski, K.A., Berman, S. (2010) "Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines", *WWMR, CDC, December 17*, pp.1-110 .
61. McGregor, J.A., French, J.I. (1998) "Chlamydia trachomatis infection during pregnancy", *Am J Obstet Gynecol*, v. 164, n. 6, pp. 1782-1789.
62. Simões, J.A., Giraldo, P.C., Ribeiro Filho, A.D. (1996) "Infecções cervicovaginais durante a gravidez", *Femina.* v. 24, pp. 885-893.
63. Waites, K.B., Katz, B., Schelonka, R.L. (2005) "Mycoplasmas and Ureaplasmas as neonatal pathogens" *Clin Microbiol Rev.* Oct, 18(4), pp.757-789.
64. Cassell, G.H., Waites, K.B., Watson, H.L., Crouse, D.T., Harasawa, R. (1993) "Ureaplasma urealyticum intrauterine infection: role in prematurity and disease in newborns", *Clin Microbiol, Rev*, 6, pp. 69–87.
65. Waites, K.B. (2008) "Ureaplasma infection" *eMedicine Infectious Diseases*, Updated, Mar, 27.
66. Volgman, T., Ohlinger, R., Panzig, B. (2005) "Ureaplasma Urealyticum-harmless commensal or underestimated enemy of human reproduction? A review", *Arch Gynecol Obstet.* Dec, 273(3), pp. 133-9.

67. Kirchner, L., Helmer, H., Heinze, G., Wald, M., Brunbauer, M., Weninger, M., Zaknun, D. (2007) "Amnionitis with *Ureaplasma Urealyticum* or other microbes leads to increased morbidity and prolonged hospitalization in very low birth weight infants", *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, Sep, 134(1), pp. 44-50.
68. Abele-Horn, M., Peters, J., Genzel-Boroviczeny, O., Wolff, C., Zimmermann, A., Gottschling, W. (1997) "Vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization: influence on pregnancy outcome and neonatal morbidity", *Infection*, 25, pp. 286–291.
69. Maeda, S., Deguchi, T., Ishiko, H., Matsumoto, T., Naito, S., Kumon, H., Tsukamoto, T., Onodera, S., Kamidono, S. (2004) "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", *Int J Urol*, 11, pp. 750–754.
70. Yokoi, S., Maeda, S., Kubota, Y., Tamaki, M., Mizutani, K., Yasuda, M., Ito, S., Nakano, M., Ehara, H., Deguchi, T. (2007) "The role of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* biovar 2 in postgonococcal urethritis", *Clin Infect Dis*, 45, pp. 866–871.
71. Pitcher, D., Sillis, M., Robertson, J.A. (2001) "Simple method for determining biovar and serovar types of *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates using PCR-single-strand conformation polymorphism analysis" *J Clin Microbiol*, 39, pp. 1840-4.
72. Stein, A., Boubli, L., Blanc, B., Raoult, D. (1994) "Genital mycoplasmas in placental infections", *Infect Dis Obstet Gynecol*, 1, pp. 275-81.
73. Stray-Pedersen, B., Eng, J., Reikvam, T.M. (1978) "Uterine T-mycoplasma colonization in reproductive failure", *Am J Obstet Gynecol*, Feb 1, 130(3), pp. 307-11.

74. Stray-Pedersen, B., Bruu, A.L., Molne, K. (1982) "Infertility and uterine colonization with *Ureaplasma urealyticum*", *Acta Obstet Gynecol Scand*, 61(1), pp. 21-4.
75. Weström, L., Wolner-Hanssen, P.(1993) "Pathogenesis of pelvic inflammatory disease", *Genitourin Med*, 69, pp. 9-17.
76. Horn, M.A., Wolfe, C., Dressel, P., Pfaff, F., Zimmermann, A. (1997) "Association of *Ureaplasma urealyticum* biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease", *J Clin Microbiol*, May, 35(5), pp.1199–202.
77. De Francesco, M. A., Negrini, R., Pinsi, G., Peroni, L., Manca, N. (2009) "Detection of *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28, pp. 641–646.
78. Viscardi, R.M. (2010) "Ureaplasma Species: Role in diseases of prematurity", *Clin perinatal*. Jun, 37(2), pp. 393-409.
79. Zaki, M.E.S., Raafat, D., El Emshaty, W., Azab, M.S., Goda, H. (2010) "Correlation of *Trichomonas vaginalis* to bacterial vaginosis: a laboratory-based study", *J Infect Dev Ctries*, 4(3), pp. 156-63.
80. Fraczek, M. & Kurpisz, M. (2007) "Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa" *J. Androl.*, 28, pp. 325-33.
81. Al Sweih, N.A., Al Fadli, A.H., Omu, A.E., Rotimi, V.O. (2012) "Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* Infections and Seminal Quality in Infertile and Fertile Men in Kuwait" *J. Androl.*, 33(6), pp. 1323-9.
82. Zinzendorf, N.Y., Kouassi-Agbessi, B.T., Lathro, J.S., Don, C., Kouadio, L. (2008) "Ureaplasma Urealyticum or Mycoplasma Hominis Infections and Semen Quality of Infertile Men in Abidjan", *J. Reprod. Contracep.*, 19, pp. 65-72.

83. Taylor-Robinson, D., Ainsworth, J.G., McCormack, W.M. (1999) "Genital mycoplasmas" in Holmes, K.K., Mardh, P.A., Sparling, P.F., Wiesner, W., Cases, S., Lemon, S.M., Stamm, W.E., Piot, P., Wasserheit, J.N. (ed.) *Sexually transmitted diseases*, 3.^a ed. p. 533-548, McGraw Hill, New York, USA.
84. Castellano, M., Ginestre, M., Perozo, A., Alaña, F., Fernández, M., Rincón, G. (2007) "Colonización vaginal por micoplasmas genitales en mujeres embarazadas y no embarazadas", *Invest Clin*, 48, pp. 419-29.
85. Clegg, A., Passey, M., Yoannes, M., Michael, A. (1997) "High rates of genital mycoplasma infection in the highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by a commercial detection kit", *J Clin Microbiol*, 35 pp. 197–200.
86. Eckert, L.O., Moore, D.E., Patton, D.L., Agnew, K.J., Eschenbach, D.A. (2003) "Relationship of vaginal bacteria and inflammation with conception and early pregnancy loss following in-vitro fertilization", *Infect Dis Obstet Gynecol*, 11, pp. 11–17.
87. Joyee, G. A., Thyagarajan, P. S., Rajendran, P., Sowmya, B., Venkatesan, C. & Ganapathy, M. (2003). Evaluation of Diagnostic Efficacy of PCR Methods for *Chlamydia trachomatis* Infection in Genital and Urine Specimens of Symptomatic Men and Women in India. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56, pp. 88-92.
88. Chan, E. L., Brandt, K., Stoneham, H., Antonishyn, N. & Hosman, G. B. (2000). Comparison of the effectiveness of Polymerase Chain Reaction and Enzyme Immunoassay in Detecting *Chlamydia trachomatis* in Different Female Genitourinary Specimens. *Arch Pathol Lab Med* 124, pp. 840-843.
89. Verkooyen, R. P., Luijendijk, A., Huisman, W. M., Goessens, W. H. F., Kluytmans, J. A., van Rijsoort-Vos, J. H. & Verbrugh, H. A. (1996). Detection of PCR inhibitors in cervical specimens by using the Amplicor *Chlamydia trachomatis* assay. *Journal of Clinical Microbiology* 34, pp. 3072-3074.

90. Vincelette, J., Schirm, J., Bogard, M., Bourgault, A. M., Luijt, D. S., Bianchi, A., Van Voorst Vader, P. C., Butcher, A. & Rosenstraus, M. (1999). Multicenter Evaluation of the Fully Automated COBAS AMPLICOR PCR Test for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Urogenital Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 37, pp. 74-80.
91. Chong, S., Jang, D., Song, X., Mahony, J., Petrich, A., Barriga, P. & Chernesky, M. (2003). Specimen Processing and Concentration of *Chlamydia trachomatis* Added Can Influence False-Negative Rates in the LCx Assay but Not in the APTIMA Combo 2 Assay When Testing for Inhibitors. *Journal of Clinical Microbiology* 41, pp. 778-782.
92. Tan, H. H. & Chan, R. (2005). Use of polymerase chain reaction on pooled cervical swabs to detect *Chlamydia trachomatis* infections in female sex workers in Singapore. *Singapore Med J* 46, pp. 215-218.
93. Van Der Pol, B., Ferrero, D. V., Buck-Barrington, L., Hook III, E., Lenderman, C., Quinn, T., Gaydos, C. A., Lovchik, J., Schachter, J., Moncada, J., Hall, G., Tuohy, M. J. & Jones, R. B. (2001). Multicenter Evaluation of the BDProbeTec ET System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Urine Specimens, Female Endocervical Swabs, and Male Urethral Swabs. *Journal of Clinical Microbiology* 39, pp. 1008-1016.
94. Loeffelholz, M. J., Lewinski, C. A., Silver, S. R., Purohit, A. P., Herman, S. A., Buonagurio, D. A. & Dragon, E. A. (1992). Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Specimens by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30, pp. 2847-2851.
95. Skulnick, M., Chua, R., Simor, A. E., Low, D. E., Khosid, H. E., Fraser, S., Lyons, E., Legere, E. A. & Kiching, D. A. (1994). Use of the Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Chlamydia trachomatis* from Endocervical and Urine Specimens in an Asymptomatic Low-Prevalence Population of Women. *Diag Microbiol and Infect Dis* 20, pp. 195-201.
96. Chernesky, M. A., Jang, D., Sellors, J., Luinstra, K., Chong, S., Castriciano, S. & Mahony, J. B. (1996). Urinary inhibitors of polymerase chain reaction

and testing of multiple specimens may contribute to lower assay sensitivities for diagnosing *Chlamydia trachomatis* infected women. *Molecular and cellular Probes* 11, pp. 243-249.

97. Mahony, J., Chong, S., Jang, D., Luinstra, K., Faught, M., Dalby, D., Sellors, J. & Chernesky, M. (1998). Urine Specimens from Pregnant and Nonpregnant Women Inhibitory to Amplification of *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acid by PCR, Ligase Chain Reaction, and Transcription - Mediated Amplification: Identification of Urinary Substances Associated with Inhibition and Removal of Inhibitory Activity. *Journal of Clinical Microbiology* 36, pp. 3122-3126.
98. Barbeyrac, B., Géniaux, M., Hocké, C., Dupon, M. & Bébéar, C. (2000). Detection of *Chlamydia trachomatis* in symptomatic and asymptomatic populations with urogenital specimens by AMP CT (Gen-Probe Incorporated) compared to others commercially available amplification assays. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 37, pp. 181-185.
99. Van Doornum, G. J. J., Schouls, L. M., Pijl, A., Cairo, I., Buimer, M. & Bruisten, S. (2001). Comparison between the LCx Probe System and COBAS AMPLICOR System for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections in Patients Attending a Clinic for Treatment of Sexually Transmitted Diseases in Amsterdam, the Netherlands. *Journal of Clinical Microbiology* 39, pp. 829-835.
100. Quinn, T. C., Welsh, L., Lentz, A., Crotchfelt, K., Zenilman, J., Newhall, J. & Gaydos, C. (1996). Diagnosis by AMPLICOR PCR of *Chlamydia trachomatis* Infection in Urine Samples from Women and Men Attending Sexually Transmitted Disease Clinics. *Journal of Clinical Microbiology* 34, pp. 1401-1406.
101. Morré, S., van Valkengoed, I. G. M., Jong, A., Boeke, A. J. P., van Eijk, J. T.M., Meijer, C. J. L. M. & Van Den Brule, A. J. C. (1999). Mail, Home-Obtained Urine Specimens: a Reliable Screening Approach for Detecting Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 37, pp. 976-980.

7. ANEXOS

Tabela 14 – Resultados de *Chlamydia trachomatis* em função da faixa etária

Faixa etária (anos)	<i>Chlamydia trachomatis</i>		Total
	Negativo	Positivo	
10 – 18	381	44	425
19 – 26	2 774	275	3 049
27 – 34	5 252	203	5 455
35 – 42	3 458	73	3 531
43 – 50	1 620	24	1 644
51 – 94	1 381	6	1 387
Total	14 866	625	15 491

Tabela 15 – Resultados de *Ureaplasma urealyticum* em função da faixa etária

Faixa etária (anos)	<i>Ureaplasma urealyticum</i>		Total
	Negativo	Positivo	
10 – 18	84	20	104
19 – 26	790	142	932
27 – 34	1675	205	1880
35 – 42	1281	142	1423
43 – 50	648	67	715
51 – 94	524	48	572
Total	5002	624	5626

Tabela 16 –Resultados de *Ureaplasma parvum* relativos à Faixa Etária

Faixa etária (anos)	<i>Ureaplasma parvum</i>		Total
	Negativo	Positivo	
10 – 18	32	30	62
19 – 26	378	238	616
27 – 34	773	448	1221
35 – 42	618	325	943
43 – 50	337	164	501
51 – 94	306	75	381
Total	2444	1280	3724

Tabela 17 –Resultados de *Mycoplasma hominis* relativos à Faixa Etária

Faixa etária (anos)	<i>Mycoplasma hominis</i>		Total
	Negativo	Positivo	
10 – 18	7	0	7
19 – 26	115	4	119
27 – 34	266	9	275
35 – 42	206	13	219
43 – 50	122	5	127
51 – 94	95	2	97
Total	811	33	844