



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**Deteção de *Neisseria gonorrhoeae* em amostras de urina de utentes de uma
consulta de venereologia**

Raquel Alexandra Carita Machado Mota Martins

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS**

FEVEREIRO, 2013



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**Deteção de *Neisseria gonorrhoeae* em amostras de urina de utentes de uma
consulta de venereologia**

Apoio financeiro do Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca, E.P.E.

Mestranda: Raquel Alexandra Carita Machado Mota Martins

Orientadora: Professora Doutora Rita Castro

Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT/UNL)

Co-orientador: Professor Doutor João Borges da Costa

Professor auxiliar convidado de Microbiologia (IHMT/UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas, especialidade de Biologia Molecular em Medicina tropical e Internacional

FEVEREIRO, 2013

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Sérgio, que esteve sempre presente para os nossos filhos e para a nossa casa quando a mãe não podia estar. Sem a sua disponibilidade e compreensão seria impossível realizar esta tese.

Ao meu filho Guilherme e Gustavo, por terem deixado a mãe (como dizia o mais velho) “fazer o trabalho” enquanto viam desenhos animados na televisão e por prescindirem da atenção da mãe, aos quais dedico esta tese.

À minha mãe e à minha sogra pelo apoio aos seus netos.

À minha orientadora, Professora Doutora Rita Castro, pelo seu incentivo e disponibilidade durante este estudo.

Ao meu coorientador, Professor Doutor João Borges da Costa, pelo seu auxílio solícito.

À Ângela, técnica da Unidade de Doenças Sexualmente Transmissíveis pela sua prestabilidade.

Ao Doutor Luís Lito do laboratório de Microbiologia do Hospital de Santa Maria, pela sua colaboração.

E por último mas não menos importante, o esforço das minhas colegas de trabalho Carla, Cristina e Sandra para permitir que fosse possível conciliar a frequência do mestrado com o nosso trabalho no Hospital Professor Doutor Fernando Fonseca E.P.E.

A todos, muito obrigado.

RESUMO

Deteção de *Neisseria gonorrhoeae* em amostras de urina de utentes de uma consulta de venereologia

Raquel Alexandra Carita Machado Mota Martins

Palavras- chave: *Neisseria gonorrhoeae*, IST, PCR.

Introdução: A vigilância epidemiológica dos agentes infecciosos é fundamental como atividade de controlo das doenças sexualmente transmissíveis. A gonorreia é uma das infeções sexualmente transmissíveis (IST) mais comum e é causada pela bactéria *Neisseria gonorrhoeae*. Os dados sobre os diferentes microrganismos causadores de IST são escassos em Portugal e a vigilância tradicional não é suficiente. Em muitos casos de infeção por *N. gonorrhoeae*, os pacientes são tratados empiricamente através de uma abordagem sindrómica por vezes sem recurso a análises laboratoriais que confirmem a infeção e, além disso, existem os casos assintomáticos que contribuem para a contínua propagação da infeção por *N. gonorrhoeae*. A gonorreia é tratável e curável mas não está disponível uma vacina. Consequentemente, o controlo desta doença depende da identificação e tratamento de indivíduos infetados e dos seus contactos na rede de transmissão. Por outro lado, quando é efetuada cultura os resultados apresentam ocasionalmente falsos negativos, devido às características exigentes de crescimento da *N. gonorrhoeae in vitro* ou à automedicação prévia do doente.

Objetivos: Avaliar a ocorrência de infeções por *Neisseria gonorrhoeae* entre utentes de uma consulta de venereologia, nos primeiros seis meses de 2011.

Métodos: Estudo transversal. Amostragem consecutiva, cálculo do número de amostras pela fórmula de Wald para um nível de confiança de 95% e um erro de previsão de 3,3%. Foram analisadas 145 amostras de urina utilizando técnicas de amplificação de ácidos nucleicos com alvos diferentes. A identificação de *Neisseria gonorrhoeae* foi efetuada pela deteção de uma sequência do pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae* por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e pela deteção de uma sequência do gene *ccpB* de *N. gonorrhoeae* por técnica de PCR. Critérios de exclusão: recusa em participar ou apresentar problemas para o entendimento do consentimento livre e informado.

Resultados: Foi detetada *Neisseria gonorrhoeae* em 8 doentes – 5,5 % de prevalência global. A prevalência entre indivíduos com infeção sexualmente transmissível prévia (n = 35) foi significativamente mais elevada (p = 0,032). Neste grupo detetou-se *N. gonorrhoeae* em 4 doentes (11,43 %). Em doentes com queixas de exsudado uretral (n = 29), foi detetada *N. gonorrhoeae* em seis (20,69 %), demonstrando que a prevalência entre os indivíduos com este sintoma é, também, significativamente mais elevada (p = 0,001). A coinfeção com *Chlamydia trachomatis* foi observada em 1,4 % dos casos (2/145). A percentagem de casos assintomáticos foi de 12,5 % (1/8). As técnicas de PCR utilizadas neste estudo demonstraram-se igualmente específicas para a deteção de

N. gonorrhoeae e ambas mais sensíveis relativamente à cultura. Neste estudo as estirpes isoladas em cultura apresentaram resistência a penicilina em 25 % dos casos, 37,5 % a tetraciclinas e 12,5 % eram produtoras de β -lactamases.

Conclusões: A prevalência determinada neste estudo encontra-se superior ao esperado. Os resultados deste estudo indicam a existência de um importante problema de saúde pública e a necessidade de considerar a implementação de rastreios em grupos específicos de população. Este estudo confirma que as técnicas de PCR com os alvos *porA* e *ccpB* são satisfatórias para a deteção de *Neisseria gonorrhoeae* em amostras de urina. Apesar da percentagem de estirpes resistentes a tetraciclinas e penicilina ser elevada não foram demonstradas resistências a fluoroquinolonas ou cefalosporinas nas estirpes estudadas.

ABSTRACT

Neisseria gonorrhoeae detection in urine samples of patients from a venereology outpatient clinic

Raquel Alexandra Carita Machado Mota Martins

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, sexually transmitted infection, PCR.

Introduction: Epidemiological surveillance of sexually transmitted infections is fundamental aspect to the success of control activities. Gonorrhoea, caused by the bacterium *Neisseria gonorrhoeae*, remains one of the most common sexually transmitted infections. Data on frequency of different STI microorganisms are scarce in Portugal and traditional epidemiologic surveillance is not sufficient. Empiric treatment is done in most of *N. gonorrhoeae* cases through a syndromic approach without recourse to laboratory analysis to confirm infection and moreover there are asymptomatic cases contributing to the continued spread of infection by *N. gonorrhoeae*. Gonorrhoea is so far treatable and curable, but no vaccine is available. Consequently, the control of this disease depends on the identification and treatment of infected individuals and their contacts in transmission networks. On the other hand when bacteria culture is done, false negative results are occasionally observed due to prior self-medication from the patient or *N. gonorrhoeae* demanding growth *in vitro* characteristics.

Objective: Evaluate the occurrence of *Neisseria gonorrhoeae* infection among patients from one venereology outpatient clinic in the first semester of 2011.

Methodology: Descriptive and cross-sectional study. Consecutive sampling, number of samples calculation done by the Wald formula to a level confidence of 95 % and prediction error of 3,3 %. 145 urine samples were processed using multi-target nucleic acid amplification tests. *Neisseria gonorrhoeae porA* pseudogene sequence was detected by real-time polymerase chain reaction (PCR) and *ccpB* gene sequence of *N. gonorrhoeae* by PCR assay. Excluding criteria: do not agreeing to participate and/or not be able to understand the informed consent.

Results: *Neisseria gonorrhoeae* was detected in 8 patients – 5,5 % overall prevalence. The prevalence among individuals with prior IST (n = 35) were significantly higher (p = 0,032). In this group *N. gonorrhoeae* was detected in 4 patients (11,43 %). In patients with complaints of discharge (n = 29), *N. gonorrhoeae* was detected in six (20,69 %), showing that prevalence among individuals with these complaints is also significantly higher (p = 0,001). Was detected coinfection with *Chlamydia trachomatis* in 1,4% of cases (2/145). The proportion of asymptomatic cases was 12,5% (1/8). The PCR assays were specific for detection of *N. gonorrhoeae* and more sensitive than culture. The isolated strains in culture from this study showed resistance to penicillin in 25 % of cases, 37,5 % to tetracycline and 12,5% were penicilase producing *N. gonorrhoeae*.

Conclusions: The prevalence determined in this study is higher than expected. The

results of this study show the existence of an important public health problem and the need to consider implementing screening in specific groups of population. This study confirms that PCR assay with targeted *porA* and *ccpB* are satisfactory nucleic acid amplification tests for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in urine samples. Despite the percentage of strains resistant to penicillin and tetracycline, increased resistance to cephalosporin or fluoroquinolone was not found.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Revisão da literatura	1
1.1.1 Agente etiológico.....	2
1.1.1.1 Patogenicidade.....	3
1.1.2 Fatores do hospedeiro que facilitam a infecção	10
1.1.3 Características da infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	13
1.1.4 Epidemiologia	13
1.1.5 Manifestações clínicas	15
1.1.6 Resistência de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> a antibióticos	16
1.1.6.1 Mecanismos da resistência aos antibióticos	19
1.1.7 Diagnóstico de infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	22
1.2 Justificação da tese	30
1.3 Objetivos	34
1.3.1 Objetivo geral.....	34
1.3.2 Objetivos específicos	34
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
2.1 Caracterização da população em estudo.....	35
2.2 Desenho do estudo.....	36
2.2.1 Colheita/Conservação das amostras de urina	36

2.2.2 Extração do DNA	37
2.2.3 Amplificação e detecção de um fragmento de 132pb do pseudogene <i>porA</i> por técnica de PCR em tempo real	37
2.2.4 Amplificação de um fragmento de 390pb do gene <i>ccpB</i> do plasmídeo críptico pJD1 por técnica de PCR e detecção do produto amplificado por eletroforese	39
2.2.4.1 <i>Primers</i> e Condições da PCR	39
2.2.4.2 Visualização dos produtos de amplificação	40
2.2.5 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição - RFLP	41
2.2.5.1 Digestão enzimática	41
2.2.5.2 Visualização dos produtos de digestão	41
2.3 População e amostragem	42
2.4 Critérios de inclusão	43
2.5 Tratamento e análise dos dados	43
3 RESULTADOS.....	44
3.1 Estatística descritiva da população e variáveis estudadas	44
3.1.2 Resultados Laboratoriais	46
3.1.3 Infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	49
3.2 Pesquisa de associações entre a infecção por <i>Neisseria gonorrhoeae</i> e as variáveis sociodemográficas e clínicas	53
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	54
4.1 Considerações gerais	54
4.2 Prevalência de infecção por <i>N. gonorrhoeae</i> na população estudada	54
4.3 Gonorreia & HIV	56
4.4 Diagnóstico de gonorreia com NAAT	57
4.5 Resistência da <i>Neisseria gonorrhoeae</i> aos ATM nas amostras estudadas	59
4.6 Limitações do estudo	60

4.7 Perspetivas futuras.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	78
Anexo 1: Análise descritiva em SPSS.....	78
Anexo 2: Análise de inferência nominal em SPSS	84
Anexo 3: Análise de inferência nominal em SPSS - Teste de MW	95
Anexo 4: Tabela de resultados e dados dos utentes	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Componentes proeminentes da membrana externa de <i>N. gonorrhoeae</i>	4
Figura 2: Corte transversal de uma fibra <i>pili</i> com os domínios variável e glicano.....	5
Figura 3: Proteína Opa na membrana externa de <i>N. gonorrhoeae</i>	7
Figura 4: Distribuição da população em estudo pelo motivo que originou a consulta.....	45
Figura 5: Gráfico das curvas de amplificação resultantes da emissão de fluorescência pelos produtos amplificados por técnicas de PCR.....	46
Figura 6: Gráfico das curvas de amplificação resultantes da emissão de fluorescência pelos produtos amplificados do controlo interno por técnicas de PCR.....	46
Figura 7: Gel de agarose com visualização de bandas de 390 pb do gene <i>ccpB</i> do plasmídeo críptico pJD1 de <i>N. gonorrhoeae</i> , após exposição a luz UV	47
Figura 8: Gel de agarose com visualização de bandas de 250 pb e 140 pb resultantes da digestão, com a enzima de restrição <i>MspI</i> , do fragmento do gene <i>ccpB</i> do plasmídeo críptico pJD1 de <i>N. gonorrhoeae</i> após exposição a luz UV.....	48
Figura 9: Distribuição do número de casos de gonorreia por grupo etário.....	49
Figura 10: Resistências das estirpes isoladas.....	51
Figura 11: Amostras Independentes no Teste U de Mann-Whitney.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estatística descritiva da população estudada.....	44
Tabela 2: Resultados da pesquisa de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> pelas diferentes técnicas de detecção/identificação.....	50
Tabela 3: Dados dos doentes com a detecção de <i>N. gonorrhoeae</i> por técnicas de PCR.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau <i>Celsius</i>
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
A	Adenosina
AMR	Resistência antimicrobiana, do inglês <i>antimicrobial resistance</i>
ATM	Antimicrobianos
C	Citosina
CDC	Centro para Prevenção e Controlo de Doenças – EUA, do inglês <i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CI	Controlo interno
CMI	Concentração mínima inibitória
DGS	Direção Geral de Saúde
dATP	2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato
dCTP	2'-desoxicitidina 5'-trifosfato
dGTP	2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
DIP	Doença inflamatória pélvica
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleótidos fosfatados
DST	Doença Sexualmente Transmissível
dTTP	2'-desoxitimidina 5'-trifosfato
ECDC	Centro para Prevenção e Controlo de Doenças – Europeu, do inglês <i>European Center for Disease Control and Prevention</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

<i>et al.</i>	“E outros”, da locução latina <i>et alii</i>
EUA	Estados Unidos da América
EU	União Europeia, do inglês <i>European Union</i>
FBP	Proteínas de ligação ao ferro, do inglês <i>ferric binding protein</i>
g	Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)
G	Guanina
HCV	Vírus da hepatite C, do inglês <i>hepatitis C vírus</i>
HIV	Vírus da imunodeficiência humana, do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
H₂O	Água
HPV	Vírus do papiloma humano, do inglês <i>Human Papiloma Virus</i>
HSM	Hospital de Santa Maria
IM	Intramuscular
IgA1	Imunoglobulina A1
IST	Infeção sexualmente transmissível
LOS	Lipoligossacarídeo
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mg	Miligrama
ml	Mililitro
MSM	Homens que têm sexo com homens, do inglês <i>men who have sex with men</i>
n	Número de indivíduos
NAAT	Técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, do inglês <i>nucleic acid amplification techniques</i>

NGRC	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente cromossomicamente
NHS	<i>National Services Scotland</i>
pb	Par de bases
PBP	Proteínas de ligação á penicilina, do inglês <i>penicilin biding protein</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica de uma solução (-log [H ⁺])
PMN	Polimorfonucleares
PPNG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase, do inglês <i>penicilinase producing Neisseria gonorrhoeae</i>
PPV	Valor preditivo positivo, do inglês <i>positive predictive value</i>
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos, do inglês <i>Restriction fragment length polymorphism</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossómico, do inglês <i>ribosomal ribonucleic acid</i>
spp.	Espécies
T	Timina
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tampão de eluição Tris-HCL
TNF-α	Fator alfa de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis α factor</i>
Tris	Tris(hidroximetilo)aminometano
U	Unidade
UV	Ultra-violeta
v	Volume
V	Volts
WHO	Organização Mundial de Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

1 INTRODUÇÃO

1.1 Revisão da literatura

A gonorreia é uma doença bacteriana do trato urogenital. Transmite-se quase exclusivamente por contato sexual ou perinatal. Afeta primariamente as membranas mucosas do trato genital inferior e menos frequentemente as do reto, orofaringe e conjuntiva. As manifestações clínicas são várias, desde a ausência total de sintomas até a ocorrência de salpingite aguda (Koneman *et al.* 1997; Hook & Handsfield 2008). As infecções gonocócicas não tratadas nas mulheres, resultam em doença inflamatória pélvica (salpingite) em mais de 40% dos casos, e um em quatro destes resultam em infertilidade. É assim uma das causas mais comuns de infertilidade feminina no mundo (Hook & Handsfield 2008).

A gonorreia insere-se no grupo das doenças humanas mais antigas. Existem referências de secreções uretrais de origem venérea nos escritos chineses, no antigo testamento bíblico (Levítico) e em outras literaturas da antiguidade. Galeno (130 d.C.) introduziu o termo gonorreia, origem do grego - *Gonos* (espermatozoide) + *rhoia* (corrimento) pela confusão do exsudado purulento com sémen. A doença foi descrita por Hipócrates (400 a.C.); Paracelso (1530) e Hunter (1767). Durante muito tempo a gonorreia foi confundida com sífilis e somente em 1838, Record estabeleceu diferença entre as duas doenças. A bactéria foi descrita pela primeira vez por Neisser (1879) e cultivada em 1882 por Leistikow e Loeffler quando a denominaram *Neisseria gonorrhoeae* (Koneman *et al.* 1997; Hook & Handsfield 2008).

Até ao advento das sulfonamidas em 1930 e da penicilina em 1943 não existia disponível terapêutica eficaz e o conhecimento a respeito do agente etiológico e da patogenia da doença permaneceu escasso durante oitenta anos. Somente no início dos anos setenta do século passado tem início uma nova era na informação acerca da doença e nos anos noventa ocorre uma revolução considerável no conhecimento da sua biologia molecular de *N. gonorrhoeae*. Esta revolução permitiu conhecer mais detalhes sobre a interação patógeno – hospedeiro, dos mecanismos de doença próprios de *N.*

gonorrhoeae, das suas resistências e da associação entre a gonorreia e a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Penna *et al.* 2000).

1.1.1 Agente etiológico

Neisseria gonorrhoeae é pertencente à família *Neisseriaceae* e membro do género *Neisseria*. Os membros deste género apresentam morfologia de coco com extremidades adjacentes e frequentemente encontram-se em número par (diplococos), não são flagelados, nem formadores de esporos, são aeróbios, com diâmetro entre 0,6 a 1,0⁶µ. O género *Neisseria* apresenta cerca de 11 espécies associadas a humanos, sendo que exclusivamente duas são patogénicas: *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis*, as outras espécies são normalmente comensais do trato respiratório superior e devido à sua virulência limitada só produzem doenças em indivíduos imunocomprometidos. As espécies de *Neisseria* oxidam os hidratos de carbono produzindo ácido (oxidase-positivas) (Koneman *et al.* 1997).

N. gonorrhoeae é uma bactéria que cora negativamente pela técnica de Gram, a qual permite diferenciar bactérias com diferentes estruturas de parede celular a partir das colorações que estas adquirem após tratamento com agentes químicos específicos. Apesar de não ter uma verdadeira cápsula de hidratos de carbono como a de *Neisseria meningitidis*, a sua superfície celular tem uma carga negativa semelhante à de uma capsula (Koneman *et al.* 1997; Hook & Handsfield 2008).

N. gonorrhoeae não tolera a redução da humidade e as amostras devem ser imediatamente inoculadas num meio de cultura apropriado. O seu crescimento é estimulado pela presença de uma certa percentagem de CO₂ (3-7%) e com temperaturas de incubação entre 35°C e 37°C. As colónias típicas surgem em 24 a 48 horas, porém a sua viabilidade no meio perde-se rapidamente por autólise por serem sensíveis a condições ambientais adversas. O meio apropriado para o seu isolamento é o agar-chocolate com vancomicina, colistina e nistatina (meio de Thayer-Martin) ou o anterior adicionado de trimetoprim (meio de Thayer-Martin modificado) para inibir também as espécies de proteus. Os agentes antimicrobianos (ATM) inibem o crescimento das

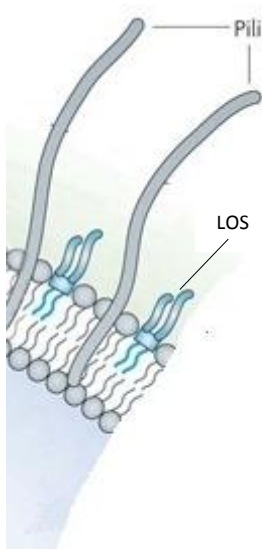
espécies não patogênicas de *Neisseria* e outras espécies contaminantes e permitem o crescimento de *Neisseria gonorrhoeae*. As amostras de produtos estéreis, como por exemplo sangue, líquido cefalorraquidiano e líquido sinovial devem ser cultivadas em meios livres de antibióticos (Koneman *et al.* 1997).

1.1.1.1 Patogenicidade

Uma propriedade de *Neisseria gonorrhoeae* é a habilidade de modular os seus antígenos de superfície com elevada rapidez. Esta capacidade e a ocorrência de mutações pontuais são a base do seu sucesso como patogénico estritamente humano. A variação extensiva de superfície também dificulta o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra *N. gonorrhoeae*. Várias moléculas são produzidas pela bactéria para permitir a colonização e/ou infecção do hospedeiro, incluindo adesinas, que são fatores cruciais na colonização inicial da mucosa humana. Caracteristicamente, este patógeno pode modular a expressão e a estrutura das adesinas e manter a capacidade de ligação às células epiteliais (Sparling 2008).

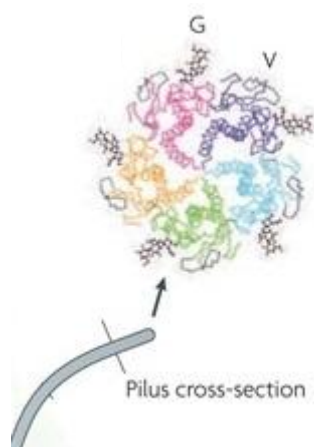
N. gonorrhoeae estabelece infecção do trato urogenital interagindo com as células epiteliais não ciliadas, resultando em invasão celular. Mas, diferentes mecanismos moleculares estão envolvidos durante o seu estabelecimento na superfície da mucosa feminina e masculina. A infecção gonocócica provoca, normalmente, uma resposta inflamatória intensa e influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) provocando descargas purulentas, sobretudo nos homens. A descarga purulenta é constituída por um exsudado composto por leucócitos PMN com diplococos internalizados após fagocitose. Contudo, a infecção nas mulheres é frequentemente assintomática devido à diferente origem embriológica do trato urogenital feminino. O modo de transmissão de *N. gonorrhoeae* limita a população em risco, contudo, após o contato sexual com um parceiro infetado o risco de infecção nas mulheres é superior ao risco de infecção nos homens devido, em parte, pela sua capacidade de se ligar ao esperma humano (Edwards & Apicella 2004).

A troca livre entre genes (conversão de genes) dos genomas de *Neisseria* spp. é um mecanismo proeminente para aquisição de novos traços e é facilitado pela competência natural das espécies de *Neisseria*. Acredita-se que o DNA (ácido desoxirribonucleico) de *Neisseria* no ambiente externo tem origem através da autólise e de um sistema de secreção tipo IV de *Neisseria gonorrhoeae*, que transporta DNA ativamente para fora da célula (Hamilton & Dillard 2006).



Pili - As estruturas chave na interface entre o hospedeiro e *N. gonorrhoeae* são o lipooligossacarido (LOS), que protege a superfície da bactéria dos mecanismos imunes efetivos inatos e adaptativos do hospedeiro, e as proteínas de superfície que são conhecidas como *pili* (projeções longas tipo filamento que se estendem por vários micrómeros a partir da superfície da bactéria; também conhecidas como fimbrias e com função de adesão e invasão) (figura 1) (Virji 2009).

Figura 1: Componentes proeminentes da membrana externa de *N. gonorrhoeae* (adaptado de Brady (n.d.))



Num corte transversal de uma dessas estruturas existe os domínios variáveis (V) e glicanos (G) localizados externamente, enquanto os domínios constantes se localizam na parte interna da estrutura, protegidas do ambiente hospedeiro (figura 2) (Virji 2009).

Figura 2: Corte transversal de uma fibra *pili* com os domínios variável e glicano (adaptado de Virji 2009).

A porção da molécula mais exposta à interação com o sistema imune dos hospedeiros é a sequência de aminoácidos altamente variável.

A pilina (proteína constitutiva dos *pili*) de quase todas as estirpes de *Neisseria gonorrhoeae* é antigênicamente diferente, e uma estirpe pode produzir muitas formas distintas de pilina. No caso dos *pili* a bactéria possui um repertório antigênico que pode chegar a um milhão de variações.

Os *pili* e as proteínas transmembranares Opa facilitam a adesão aos tecidos do hospedeiro. Além da adesão, os *pili* estão envolvidos em outras funções, por exemplo, facilitam a captação de DNA estranho do meio extracelular, aumentando a frequência de transformação da bactéria e mantendo a diversidade genética que sustenta o sucesso das espécies de *Neisseria* no hospedeiro humano.

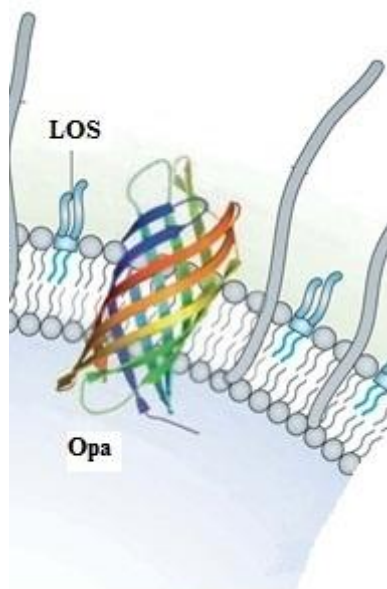
A variação dos *pili* é feita de duas formas, relativamente frequentes: pela variação antigênica, na qual as estirpes alteram o tipo antigênico dos seus *pili*; e a variação de fase, na qual as estirpes alternam entre os estados P⁺ e P⁻ (Sparling 2008).

Existe um ou, por vezes, dois genes *pili* completos no cromossoma e existem seis a oito regiões silenciosas no cromossoma. Cada *locus* silencioso contém várias sequências de *pili*, mas falta-lhes a região promotora e a região terminal 5' do gene estrutural de *pili*. Muitas destas cópias das sequências de *pili* são ligeiramente diferentes

umas das outras. Quando eventos não recíprocos de recombinação ocorrem podem mover uma destas cópias variantes para o local de expressão, resultando na expressão de uma variante antigénica de *pili* completamente funcional (variação antigénica). Por vezes a cópia silenciosa, variante do DNA de *pili* codifica um péptido com defeito que quando é expresso resulta num *pili* não funcional, tornando a célula P⁻. A regressão ao estado P⁺, ocorre quando uma sequência de um *pili* funcional é movida de uma cópia silenciosa variante para o local de expressão, substituindo as sequências de *pili* com defeito (variação de fase) (Snyder *et al.* 2005).

A existência de três promotores para cada gene estrutural de *pili* (*pilE*) sugere mecanismos complexos do controlo da transcrição na expressão de *pili*. Foi descrito um sistema sensor regulador *pilA pilB* que induz e reprime a expressão do *pilE*.

Existem ainda outras proteínas de membrana associadas aos *pili*, como as PilC, PilT e PilQ, com as quais os *pili* têm uma ação coordenada tornando-os funcionalmente mais eficientes. A PilQ é a maior proteína de membrana com 12 subunidades, pela qual passam os *pili* do meio interno para o externo da membrana bacteriana; pertence à classe de proteínas secretoras. Foi evidenciado que a PilQ também é uma porina pela qual os antibióticos e o grupo heme passam em certas circunstâncias. O PilC é uma proteína hidrofóbica de membrana e o produto de dois genes (*pilC1* e *pilC2*), os quais, cada um produz uma forma de proteína ligeiramente diferente. Aparentemente, é a PilC que ligada ao *pili* atua como adesina e que liga a bactéria à célula do hospedeiro. A PilT é uma proteína menor que serve para retrair o *pili* servindo para manter a bactéria próximo das células do hospedeiro (Sparling 2008).



Proteínas de opacidade (Opa) – As proteínas Opa de *Neisseria* spp. transmitem maior opacidade às colônias que expressam estas proteínas, os clones com Opa⁻ são transparentes. As proteínas Opa (adesinas) são da família de moléculas transmembranares e formam oito cadeias de estruturas em folha β na membrana externa da bactéria com quatro *loops* expostos á superfície (figura 3) (Virji 2009). Estas proteínas facilitam a aderência entre as bactérias e as células eucariotas (neutrófilos e células epiteliais) e atuam na evasão ao sistema imune por variação antigénica, coadjuvando á invasão do hospedeiro (Dehio *et al.* 1998)

Figura 3: Proteína Opa na membrana externa de *N. gonorrhoeae* (adaptado de Brady (n.d.))

Uma única estirpe pode expressar nenhuma a quatro ou cinco proteínas Opa simultaneamente e a alternância da fase “on/off” dos distintos genes *opa* aumentam a variação antigénica. As proteínas Opa sofrem variação de fase (Opa⁺ e Opa⁻) e variação antigénica (*opaA*, *opaB*, *opaC*...), de uma forma análoga às variações *pili*. Cada gene *opa* é um gene completo com zona promotora, e é sempre transcrito em ácido ribonucleico (RNA). A variação de expressão destes genes é conseguida variando a unidade pentamérica de repetição localizada imediatamente a seguir ao codão de iniciação ATG. Quando o número das repetições é divisível por 3 (ex. 9, 12, 15) o gene, ainda assim, apresenta-se no quadro de leitura, e é expressa uma proteína Opa (Opa⁺). Qualquer outro número de repetições da unidade pentamérica resulta na transcrição do gene que está fora do quadro de leitura de tradução e nenhuma proteína Opa é expressa (Opa⁻).

Cada gene *opa* contém dois domínios hipervariáveis, que podem recombinar com domínios semelhantes em outros *loci opa*. Assim, a expressão variável dos genes *opa* resulta em variação antigénica, devido às diferenças nas estruturas codificadas por diferentes genes *opa* (Sparling 2008).

Lipoligosacarídeo (LOS) - O peptidoglicano da membrana externa de *Neisseria gonorrhoeae* possui LOS, que não tem agarrado ao core da molécula uma longa cadeia polimérica de carboidratos, assim, ao contrário do lipopolissacarídeo (LPS) das outras bactérias Gram negativas, o LOS é consideravelmente mais pequeno. Existe uma grande variação de LOS entre estirpes e na mesma estirpe de *N. gonorrhoeae*.

Uma única estirpe pode ter até seis variantes de LOS. Uma vez que os açúcares envolvidos no core do LOS formam antigénios importantes para as reações bactericidas, a variação fenotípica destes antigénios pode ser patogénicamente importante. *N. gonorrhoeae* com LOS curto é sensível à resposta imunológica do hospedeiro e tem a capacidade de invadir as células eucarióticas, enquanto *N. gonorrhoeae* com LOS comprido não é sensível à resposta imunológica mas não é invasiva. Os genes envolvidos na estrutura do LOS sofrem variação de fase por um mecanismo semelhante ao envolvido na variação *Opa*. Certos locais do LOS imitam a estrutura de certos glicoesfingolipídios humanos ajudando à evasão ao sistema imune do hospedeiro. A variação no *core* de açúcares do LOS tem várias implicações importantes para a patogénese (Patrone & Stein 2007). A habilidade da bactéria sializar o LOS (adição do ácido neuramínico ao LOS pela sialitransferase) varia, porque o local a sializar encontra-se num açúcar terminal que é variavelmente expresso. Os gonococos sializados estão parcialmente protegidos contra os anticorpos anti-LOS e anti-Por (Sparling 2008).

A toxicidade nas infeções por *N. gonorrhoeae* é devida, em grande parte, aos efeitos endotóxicos do peptidoglicano e do LOS, ambos estimulam a resposta inflamatória e a libertação do fator α de necrose tumoral (TNF- α), responsável pela maioria dos sintomas associados à doença (Virji 2009).

Proteases da Ig A – A protease que reconhece a imunoglobulina A1 (IgA1), secretória e sérica como substrato, é produzida por todas as estirpes de *N. gonorrhoeae*.

Existem duas variantes da protease, genética e bioquimicamente distintas. Cada uma delas cliva a IgA1 resultando em dois fragmentos. Uma vez que a IgA1 secretória é a principal arma de defesa imune mediada por anticorpos nas superfícies da mucosa, a sua clivagem pela protease prolonga a sobrevivência bacteriana extracelular nas mucosas do hospedeiro. A perda da protease limita a habilidade de *N. gonorrhoeae* crescer nas células epiteliais, aparentemente porque a protease da IgA1 cliva uma proteína intracelular (LAMP1) envolvida na compartimentação do fagossoma, mas não demonstrou reduzir a infetividade de *N. gonorrhoeae* (Sparling 2008).

Porinas - As porinas triméricas Por são as proteínas mais abundantes entre as espécies de *Neisseria*, elas formam os poros hidrófilos de nutrientes e de iões na membrana externa. Foram identificadas duas classes de proteínas Por (P1A e P1B), estas porinas são altamente imunogénicas, o que as torna importantes marcadores serológicos e potenciais antígenos de proteção. Uma dada estirpe produz uma ou outra, mas nunca ambas proteínas P1A ou P1B, sendo o produto do gene *porB* (Sparling 2008).

A porina P1B de *N. gonorrhoeae* tem a propriedade de modular a apoptose da célula eucariótica através da interação com os canais dependentes de voltagem aniónica nas mitocôndrias. As porinas também auxiliam na invasão celular e cooperam com os *pili* para modular a sinalização celular através da indução sequencial do fluxo de cálcio e na mobilização do cálcio intracelular para as células alvo (Virji 2009).

PIII - A PIII é uma proteína passível de modificações por redução (RMP), é a proteína mais conservada em *N. gonorrhoeae*, associa-se às proteínas Por na formação de poros na superfície celular. Esta proteína modifica o seu peso molecular aparente quando se encontra no estado reduzido. Além disso, é uma proteína de interesse na patogénese porque muitos dos anticorpos com atividade bactericida contra *N. gonorrhoeae* são contra este antígeno (Sparling 2008).

Proteína H8 – Conhece-se pouco, acerca desta proteína, mas existem pelo menos duas proteínas com epítipo de ligação reconhecido por anticorpos monoclonais H8, em *N. gonorrhoeae*. Uma delas é a lipoproteína azurina (Laz) que está envolvida na defesa contra o *stress* oxidativo e toxicidade do cobre (Sparling 2008).

FBP – Algumas das proteínas de ligação ao ferro são recetores de ligandos de ferro, como a transferrina, lactoferrina e hemoglobina. *N. gonorrhoeae* possui recetores funcionais de transferrina e hemoglobina, mas nem todos possuem recetores funcionais de lactoferrina. Em estudos com voluntários humanos estabeleceu-se que os recetores da lactoferrina e da transferrina são essenciais para a infeção experimental da uretra anterior; a presença de ambos os recetores confere uma vantagem seletiva na uretra masculina. Desta forma, os recetores de lactoferrina e transferrina parecem assim ser funcionalmente importantes para a infeção da mucosa. A expressão do recetor de hemoglobina é sujeito á variação de fase e foi demonstrado que os isolados de mulheres nas primeiras duas semanas do ciclo menstrual têm maior expressão destes recetores quando comparados com os isolados de mulheres na outra metade do ciclo ou isolados de homens, sugerindo que a disponibilidade de hemoglobina seja uma vantagem seletiva para a bactéria *in vivo* (Sparling 2008).

1.1.2 Fatores do hospedeiro que facilitam a infeção

Nas infeções sexualmente transmissíveis, tal como em muitas outras infeções, raramente existe uma única causa mas sim, simultaneamente, múltiplos determinantes ao nível individual e populacional a afetar a transmissão e incidência. A sexualidade humana e o comportamento sexual é o núcleo central em torno do qual os determinantes de IST giram e são importante vetor para a transmissão e evolução dos agentes.

Idade - A grande variabilidade na atividade sexual dos adolescentes é globalmente influenciada por muitos fatores: geografia; a idade da primeira relação sexual; tradição, religião e/ou regulamentação legal do sexo; industrialização, desemprego e desigualdade económica; consumo de álcool ou drogas de abuso; intervenções nos comportamentos, incluindo educação sexual nas escolas; influências parentais e dos media; padrões de redes sociais e sexuais durante a adolescência, incluindo a utilização de internet (Koneman *et al.* 1997; Nahmias & Nahmias 2011).

Género - O sexo oferece, por si só, uma ferramenta de poder do género em muitas situações, desde a violação durante os conflitos armados à violência doméstica, e

tem feito isso durante o curso da história. Tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, é difícil para uma mulher insistir para que o seu parceiro use o preservativo durante a relação se ele não o quiser (Swartzendruber *et al.* 2011). Contudo, a desigualdade económica e a pobreza engrossam esta falta de poder, globalmente as mulheres têm pouco poder não só nas suas relações mas na sociedade em geral – desigualdade de género. Esta vulnerabilidade pode conduzir ao trabalho sexual para se sustentar ou simplesmente a incapacidade de se proteger de um parceiro infetado. O preservativo de látex é eficaz na profilaxia da gonorreia genital. Por outro lado, a utilização de contraceptivos orais, aumentam o risco de contrair a gonorreia. O fácil acesso às pílulas anticoncepcionais permitiu maior liberdade sexual às mulheres, aumentando a exposição ao agente causador, fazendo delas um importante fator de transmissão, por serem, muitas vezes, portadoras assintomáticas da doença. Durante os últimos cinquenta anos, as mulheres aumentaram o seu comportamento sexual de risco (particularmente nos países desenvolvidos) onde o comportamento de risco nos homens permaneceu intato. A vulnerabilidade biológica da mulher devido ao seu nicho genital, aumenta o risco de aquisição de muitas infeções sexualmente transmissíveis, incluindo a infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), quando comparadas com os homens. Para os homens o maior risco de aquisição de infeções sexualmente transmissíveis (IST) associado ao género está relacionado com atividades sexuais entre homens (Nahmias & Nahmias 2011).

Orientação sexual - A atividade sexual entre homens está associada ao risco de IST, incluindo a probabilidade aumentada de aquisição do HIV para o recetor de sexo anal.

Um outro aspeto importante para a disseminação de IST/HIV é a ponte de relações entre heterossexuais e homossexuais. Os estudos feitos sobre esta matéria descrevem que a proporção de homens que têm sexo com homens (MSM) que teve sexo heterossexual é grande (Koneman *et al.* 1997; Hook & Handsfield 2008; Nahmias & Nahmias 2011).

Whittington *et al.* (2002) cita vários estudos que revelam a reemergência de gonorreia entre MSM na Europa.

Comportamento sexual específico - Sabe-se que o risco de aquisição de gonorreia na prática de sexo oral é aumentado, estes “novos” nichos com novos agentes a coexistir podem por sua vez afetar a evolução destes agentes (Johnson *et al.* 2001).

Em 2010 foi publicado um estudo realizado pela Universidade do Indiana onde se verificou que o sexo oral e anal aumentou, naquela região, comparativamente a 1992. Um estudo realizado pela vigilância nacional do Reino Unido demonstrou resultados idênticos (Nahmias & Nahmias 2011).

Reincidência - Pacientes reincidentes com infecções por *N. gonorrhoeae* contribuem de forma intensa para o aumento da incidência de gonorreia desde que continuem a manter relações sexuais sob as mesmas condições e com o mesmo tipo de população. Estas pessoas possuem maior risco de contrair uma segunda infecção, uma vez que uma primeira infecção não confere proteção contra outra exposição ao microrganismo. A reincidência é um problema especialmente preocupante em doentes jovens (Rice *et al.* 1991).

Mobilidade - A complexidade e heterogeneidade das redes sexuais da atualidade associada às viagens, migração, e internet elevam a disseminação das IST a uma escala global. Altas taxas de deslocamentos geográficos e sociais, acompanhadas de solidão e privação dos direitos individuais, aumentam a frequência de relações sexuais. O papel que os camionistas tiveram na disseminação da epidemia do HIV na África subsaariana, é exemplo disso (Nahmias & Nahmias 2011). A pobreza e as desigualdades económicas estão intimamente relacionadas com a migração e a sua relação com o risco acrescido de IST está ligada ao acesso reduzido à educação e/ou à saúde (Rice *et al.* 1991).

1.1.3 Características da infecção por *Neisseria gonorrhoeae*

N. gonorrhoeae infeta primariamente o epitélio colunar. A ligação ao epitélio mucoso é mediada em parte pelos *pili* e pela proteína Opa. Após 24 a 48 horas, ocorre a penetração do microrganismo através das células epiteliais para chegar ao tecido submucoso. Há resposta de leucócitos PMN, com descamação do epitélio, desenvolvimento de micro abscessos submucosos e formação de exsudado (Edwards & Apicella 2004).

Em infecções não tratadas, os macrófagos e linfócitos substituem gradualmente os leucócitos PMN. Esta infiltração mononuclear e linfocitária anormal persiste nos tecidos por várias semanas após as culturas se tornarem negativas e a ausência de detecção de *N. gonorrhoeae* pela histologia (Penna *et al.* 2000).

A cura de uma infecção por *N. gonorrhoeae* não confere uma resposta protetora ao indivíduo, apesar do sistema imune produzir resposta adequada com anticorpos anti-*N. gonorrhoeae*, que inclui IgA1, contra as proteínas da superfície bacteriana. A principal razão para uma reinfeção é a variabilidade antigénica de superfície celular da bactéria, especialmente a dos *pili*, opa e LOS fazendo com que a resposta imunológica seja ineficaz (Virji 2009).

1.1.4 Epidemiologia

A reduzida forma de transmissão desta bactéria, sendo a mais comum, a via sexual, ou o fato de ter o ser humano como seu único hospedeiro, não impede o sucesso e a persistência histórica da bactéria como patogénio amplamente distribuído, fazendo da gonorreia, uma das doenças bacterianas sexualmente transmissíveis, mais importante.

A lacuna da ausência de um modelo animal, devido á infecção por *N. gonorrhoeae* ser estritamente humana, e a variabilidade antigénica da bactéria tem prejudicado o desenvolvimento de uma vacina para a gonorreia.

O controlo da gonorreia em muitas populações tem sido difícil e permanece um exemplo primário da influência que os fatores demográficos, sociais e comportamentais exercem na epidemiologia de uma doença infecciosa. A gonorreia e outras doenças sexualmente transmissíveis são geralmente transmitidas por pessoas com infeções assintomáticas ou que têm sintomas ignorados ou não percebidos. Estima-se que 50 % das mulheres e 10 % dos homens infetados com *N. gonorrhoeae* sejam assintomáticos (MacDonald *et al.* 2011).

A resposta comportamental aos sintomas parece ser determinada pela educação e por vários fatores demográficos e socioculturais, com exceção onde a atividade sexual se mantém por necessidade económica ou outros fatores como o uso de drogas. A maioria das pessoas com sintomatologia genital cessa a atividade sexual e procura assistência médica. Muitos dos transmissores da doença pertencem a um subgrupo de pessoas infetadas que não possuem ou não valorizam sintomas e não cessam espontaneamente a atividade sexual (Penna *et al.* 2000).

A infeção gonocócica apresenta alta contagiosidade, sendo o Homem o reservatório natural de *N. gonorrhoeae*, uma vez que a bactéria é patogénico estritamente humano. O Homem doente constitui a fonte de infeção, tendo por isso, papel de grande veículo disseminador. As mucosas, genital e anal, representam a porta de entrada e saída do agente etiológico (Penna *et al.* 2000).

Importa também referir que as IST, nomeadamente a gonorreia, são o principal fator facilitador da transmissão sexual do HIV. Estudos epidemiológicos forneceram fortes evidências de que estas infeções aumentam significativamente o risco de aquisição do HIV (Fleming & Wasserheit 1999).

A inflamação associada à infeção sexualmente transmissível enriquece os tecidos das mucosas com células ativadas que são recetivas á infeção pelo HIV, podendo aumentar assim o acesso físico a tais células. Igualmente importante é o fato da inflamação do trato reprodutor poder aumentar os níveis de HIV nas secreções genitais e conduzir ao aumento da infecciosidade e da possibilidade de transmissão do HIV (Cohen *et al.* 1997).

1.1.5 Manifestações clínicas

Depois do contato sexual com um parceiro infetado e vencidas as barreiras naturais da mucosa, após um período de incubação relativamente curto (2 a 5 dias), a infecção evolui, para a doença. Dá-se um processo localizado, em alguns casos sem maiores repercussões, enquanto em outros ocorrem complicações no próprio aparelho urogenital ou à distância, provocando alterações sistêmicas (Penna *et al.* 2000).

No homem - A uretrite aguda representa a manifestação mais frequente. Os principais sinais e sintomas são o corrimento uretral e dificuldade em urinar (disúria). O corrimento pode ser inicialmente mucoide, tornando-se purulento em 1 a 2 dias. A maioria dos casos de uretrite gonocócica não tratada evolui para cura espontânea em algumas semanas. Uma pequena percentagem de homens é assintomática, não apresentando sinais de uretrite. No homem, dependendo da extensão da infecção às glândulas anexas, poderão ocorrer complicações, como prostatite, epididimite e orquite. A orquiepididimite poderá provocar a diminuição da fertilidade, levando até a esterilidade. Pode também evoluir para quadros sistêmicos, com todas as suas manifestações, como a artrite gonocócica, a síndrome de Fitz-Hugh & Curtis (perihepatite gonocócica) e complicações cardíacas e nervosas (Koneman *et al.* 1997; Hook & Handsfield 2008).

Na mulher - O canal endocervical é o local primário da infecção gonocócica. O período de incubação da gonorreia na mulher é mais variável e menos definido que nos homens. Contudo, a maioria torna-se sintomática no espaço de tempo de 10 dias. Os sintomas predominantes resultam de cervicite, por vezes uretrite, os sinais mais frequentes incluem corrimento vaginal, disúria e metrorragias. Na mulher, quando a gonorreia não é tratada, a infecção pode ascender às trompas e ovários originando a chamada doença inflamatória pélvica (DIP), que é a mais importante complicação da infecção gonocócica na mulher. A DIP pode estar relacionada com endometrite, salpingite e peritonite. Alterações tubárias podem ocorrer como complicação dessa infecção, levando em 10% dos casos à oclusão tubária e à infertilidade. Nos em que não há obstrução, o risco é o de desenvolvimento de gravidez ectópica. A síndrome de Fitz-Hugh & Curtis na mulher resulta primariamente por extensão direta de *N.gonorrhoeae*

ou *Clamidia trachomatis* da trompa de Falópio à cápsula hepática e ao peritoneu adjacente (Koneman *et al.* 1997; Hook & Handsfield 2008).

Outras manifestações - Na gonorreia anorectal a maioria das pessoas permanece assintomática mas algumas apresentam proctite aguda, com dor, prurido, descarga purulenta e hemorragia retal.

A maioria das infecções faríngeas também permanece assintomática. A infecção da conjuntiva ocular por *N.gonorrhoeae* é geralmente grave, com exsudado purulento, e a ulceração corneana pode ocorrer se a infecção não for tratada com brevidade.

Cerca de 2% dos pacientes não tratados evoluem para a infecção gonocócica disseminada, manifestando artralgia, mialgia, artrite simétrica e lesões dermatológicas. Ocasionalmente provoca complicações, como endocardite e meningite.

A gonorreia na gravidez está associada ao risco aumentado de aborto espontâneo, parto prematuro, rutura prematura de membranas e mortalidade fetal perinatal.

A conjuntivite gonocócica do recém-nascido representa a manifestação mais comumente reconhecida das infecções neonatais por *N.gonorrhoeae* transmitida por mães infetadas. O recém-nascido exposto á gonorreia pode também desenvolver doença sistémica, com sepsis e artrite (Koneman *et al.* 1997; Hook & Handsfield 2008).

1.1.6 Resistência de *Neisseria gonorrhoeae* a antibióticos

A resistência antimicrobiana (AMR) em *N. gonorrhoeae* tornou-se aparente logo após a introdução dos antibióticos na prática clínica. O aparecimento de estirpes de gonococos pouco sensíveis aos antibióticos tem causado interesse nos últimos anos no campo das doenças sexualmente transmissíveis. A AMR de *N. gonorrhoeae* aumentou rapidamente nos últimos anos e reduziu as opções de tratamento. O relatório de vigilância, do Centro para Prevenção Controlo de Doenças Europeu (ECDC), da suscetibilidade antimicrobiana gonocócica na Europa em 2010 ilustra que este microrganismo se tornou mais resistente aos agentes de tratamento mais comuns e

demonstra suscetibilidade reduzida aos novos antibióticos, tornando a gonorreia uma doença potencialmente incurável num futuro próximo (ECDC 2012).

A resistência às sulfonamidas desenvolveu-se rapidamente e, durante a segunda guerra mundial essa terapêutica já não era eficaz. Foi então introduzida a penicilina. O tratamento efetuado com dose única de penicilina produzia cura em 100% dos casos. No entanto, a expectativa de que *N. gonorrhoeae* viesse a desaparecer com o uso da penicilina não se concretizou, sendo que durante a década 1950-1960 vários relatos descreviam uma redução da sua sensibilidade à penicilina. Por volta de 1980 era necessária uma dose terapêutica 16 vezes superior àquela utilizada no tratamento em 1943. Em 1976 foram efetuados os primeiros relatos do isolamento de estirpes de *N. gonorrhoeae* produtoras de penicilinase (PPNG). Essas estirpes são completamente resistentes à terapia com penicilina (Patel *et al.* 2011).

A partir do final da década de 1980 começaram a ser descritos altos níveis de resistência cromossômica, envolvendo várias drogas comumente utilizadas no tratamento da gonorreia. Entre estes fármacos estão a espectinomicina (aminoglicosídeo), cuja resistência adquirida se deve a uma única mutação. Este fármaco foi introduzido para a terapia de infecções por *N. gonorrhoeae* resistente ou em pacientes alérgicos a outros fármacos. A espectinomicina também pode ser considerada como uma opção terapêutica para as pessoas com infecção gonocócica urogenital que não toleram as cefalosporinas. No entanto, é provável que permaneça como um tratamento alternativo, em vez de um recomendado, porque os níveis de resistência desenvolvida, quando este aminoglicosídeo foi amplamente utilizado em meados da década de 1980, foram elevados. O primeiro isolado de *N. gonorrhoeae* resistente a espectinomicina, foi relatado na Índia, em 2002. A maioria de *N. gonorrhoeae* permanece sensível a espectinomicina, exceto num relatório que descreve três estirpes na Europa, que são, aparentemente, de uma só vez mutantes resistentes de alto nível (Patel *et al.* 2011).

Duas gramas de azitromicina (macrólido), por via oral, têm mostrado ser eficazes como terapêutica para a infecção gonocócica não complicada, podendo dessa forma ser considerada a opção para as pessoas que têm reações alérgicas severas a cefalosporinas. No entanto, a preocupação sobre o desenvolvimento de resistência

antimicrobiana aos macrólidos devido à sua utilização generalizada, recomenda o uso restrito desse tratamento apenas às circunstâncias indicadas (CDC 2012a).

Em 1989, em resposta ao aumento da frequência de isolamento de estirpes resistentes a penicilina, tetraciclina, estreptomicina e espectinomicina nos EUA e também em todo o mundo, o CDC recomendou a utilização das cefalosporinas ou fluoroquinolonas de amplo espectro para o tratamento de primeira linha da gonorreia não complicada. Políticas similares foram adotadas por várias organizações nacionais em outras partes do mundo (Patel *et al.* 2011). Percebeu-se que, entre as quinolonas, as fluoroquinolonas tinham excelente absorção oral e boa distribuição nos tecidos. As fluoroquinolonas alcançam excelentes níveis nos fluidos intersticiais e a penetração nos macrófagos é boa. Devido à sua excelente segurança e tolerabilidade, estas tornaram-se alternativas populares à penicilina e derivados de cefalosporina, no tratamento de várias infecções, incluindo infecção gonocócica (Garcia *et al.* 2008). As fluoroquinolonas foram brevemente consideradas o agente antimicrobiano "ideal", uma vez que estas possuíam um largo espectro de atividade antimicrobiana. Rapidamente, o que parecia a solução para um problema revelou-se uma desilusão (Patel *et al.* 2011).

Até ao final de 1992, foram documentados no Japão mais de quarenta por cento de isolados resistentes à ciprofloxacina. Depois disso, as estirpes resistentes a ciprofloxacina espalharam-se muito rapidamente da Ásia para a Austrália, Havai e América do Norte. Até ao final do ano 2000, uma explosão de isolados resistentes a ciprofloxacina foi observada na Índia. Curiosamente, com o surgimento de estirpes resistentes a fluoroquinolonas na Índia, observou-se um rápido declínio de PPNG. Em resposta ao aumento de isolados resistentes a ciprofloxacina em todo o mundo, muitos países a partir do ano 2000 descontinuaram a recomendação de fluoroquinolonas para o tratamento da gonorreia. Também na Europa se interrompeu a recomendação de ciprofloxacina em 2005 (Patel *et al.* 2011).

Da mesma forma que se observou emergência de resistência às fluoroquinolonas, pode-se futuramente deparar com a ocorrência de resistência às cefalosporinas, sendo importante determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de doentes com persistência dos sintomas após a terapia. Já começam a ser descritos isolados de *N. gonorrhoeae* com diminuição da sensibilidade às cefalosporinas de largo

espectro. Existe descrita falência terapêutica com cefixima (cefalosporina oral) no Japão, Noruega, China e Reino Unido. A diminuição da suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* á última opção de linha de tratamento (cefalosporinas) associada à demonstrada AMR à penicilina, macrólidos, tetraciclina e quinolonas tornam *N. gonorrhoeae* um microrganismo multirresistente (CDC 2007; CDC 2011a; CDC 2011b). Doentes que apresentem isolados com resistência ou diminuição de sensibilidade a penicilina, tetraciclina, cefalosporinas ou fluoroquinolonas devem ser encaminhados a um laboratório de referência para confirmar o resultado (WHO 2012a).

1.1.6.1 Mecanismos da resistência aos antibióticos

Num ambiente hostil, em que os antibióticos estão presentes, *N. gonorrhoeae* pode selecionar para as várias alterações que resultam em resistência e falência terapêutica. Os mecanismos de resistência aos antibióticos em *N. gonorrhoeae* podem ser agrupados em os que envolvem o acesso reduzido do antibiótico ao local de destino e os que envolvem a alteração do local de destino do antibiótico.

O acesso dos antibióticos ao local de destino pode ser limitado por uma redução da permeabilidade da parede celular causada por alterações nas proteínas porina; exportação ativa de antibióticos a partir da célula, por meio de bombas de efluxo; e destruição do antibiótico antes de poder interagir com o alvo.

A alteração ou supressão do local de destino dos antibióticos resulta numa redução da sua afinidade para o antibiótico. Geneticamente, essas mudanças podem ser mediadas por qualquer um dos elementos cromossômico ou extra cromossômico (plasmídeos).

Podem coexistir, num único microrganismo, diferentes determinantes de resistência de modo a que o nível de resistência possa aumentar de forma incremental e uma única estirpe possa ser resistente a vários antibióticos (Patel *et al.* 2011).

A resistência mediada pelos plasmídeos é atualmente limitada à penicilina e tetraciclina. Os plasmídeos são transmitidos por meio de conjugação. Este processo requer a presença de um plasmídeo de conjugação para mobilizar o plasmídeo que

transporta os determinantes de resistência. Uma vez que nem todas as estirpes possuem plasmídeos de conjugação, a taxa de propagação da resistência pode ser, em certa medida limitada. No entanto, os plasmídeos de conjugação também são transferíveis durante a conjugação, de modo que algumas estirpes recetoras, do plasmídeo que confere resistência, tornam-se elas próprias dadoras do plasmídeo de conjugação. Em *N. gonorrhoeae*, a resistência mediada por plasmídeo dissemina-se mais rapidamente do que a resistência mediada por cromossoma (Patel *et al.* 2011).

Três características importantes da bactéria estão na origem da resistência de *N. gonorrhoeae* aos antibióticos: 1) a habilidade do seu genoma manter-se em constante mutação e recombinação interna, resultando no envolvimento rápido das populações de *N. gonorrhoeae*; 2) a aquisição, por este microrganismo, de resistência externa total ou parcial ou de genes de virulência de outras espécies de *Neisseria*, e 3) a natureza altamente transformável da bactéria que pode libertar frequentemente DNA e incorporar eficientemente DNA exógeno adquirido de outras espécies de *Neisseria* e de bactérias relacionadas (WHO 2012a).

Resistência à penicilina - Os alvos dos agentes β -lactâmicos são as proteínas de ligação à penicilina (PBP), enzimas localizadas na parede celular que participam no seu metabolismo. Alterações nas proteínas PBP-2 e PBP-1 reduziram a sua afinidade para a penicilina, e assim a suscetibilidade do microrganismo. A PBP-2 é codificada pelo locus *penA*. O gene *mtr* medeia a sensibilidade a uma ampla gama de antibióticos, detergentes e corantes por meio de um sistema ativo de efluxo. As mutações no locus *penB* resultam na redução da permeabilidade da parede celular aos antibióticos hidrofílicos e outros compostos. O efeito combinado das mutações *penA* e expressão aumentada de *mtr* resulta em aumento da concentração mínima inibitória (CMI) de penicilina. As estirpes que apresentam estas alterações, são denominadas *N. gonorrhoeae* cromossomicamente resistente (NGRC). Além da resistência mediada pelo cromossoma, a resistência à penicilina é também mediada por um plasmídeo induzível, TEM-1 tipo β -lactamase. A enzima β -lactamase é conhecida por hidrolisar o anel β -lactâmico das penicilinas, inativando-os. A resistência mediada por cromossoma é lenta e gradual, ao contrário, a resistência mediada por plasmídeo é um processo rápido, de etapa única. Pelo menos seis plasmídeos que codificam β -lactamase foram descritos em *N. gonorrhoeae* (Hook & Handsfield 2008).

A produção de β -lactamase (PPNG) e alterações cromossômicas (NGRC) podem coexistir no mesmo isolado. Isto é importante pelo facto da utilização clínica de penicilina em combinação com inibidores de β -lactamase. Essas substâncias, tais como o ácido clavulânico e sulbactam, evitam que as β -lactamases inativem a penicilina. Em teoria, e, por vezes, na prática, estes representam uma terapia oral eficaz para infeções por PPNG, mas os regimes mais comuns de combinações dose única de penicilina / inibidor têm falhado (Patel *et al.* 2011).

Resistência a tetraciclina – A resistência a tetraciclina, de uma forma homóloga da resistência à penicilina, deve-se quer a várias mutações no cromossoma com efeitos aditivos quer à aquisição de um plasmídeo que confere resistência. As mutações nos *locus mtr*, *penB* e *tet* no cromossoma medeiam resistência de baixo nível a tetraciclina. Níveis bem mais altos de resistência são encontrados nas estirpes de *N. gonorrhoeae* que contêm o plasmídeo TC. O mecanismo de resistência mediado por este plasmídeo envolve a produção de uma proteína citoplasmática, que protege os ribossomas da ação das tetraciclina (Hook & Handsfield 2008).

Resistência às quinolonas - As quinolonas mais amplamente utilizadas para o tratamento da gonorreia são agentes de segunda geração, tais como a ciprofloxacina e ofloxacina. Tal como no caso da resistência à penicilina mediada por cromossoma, a resistência a estes antibióticos desenvolveu-se gradualmente ao longo de vários anos e várias alterações cromossômicas estão envolvidas.

O acesso das quinolonas aos seus alvos é reduzida por alterações na permeabilidade da parede celular e, possivelmente, por mecanismos de efluxo. Os alvos das quinolonas são topoisomerases, incluindo girase de DNA.

As mutações nos genes *gyrA* e *parC* medeiam resistência de alto nível às quinolonas (Garcia *et al.* 2008).

A resistência às cefalosporinas - A suscetibilidade, de *N. gonorrhoeae*, alterada às cefalosporinas é mediada cromossomicamente. Dados recentes também sugerem que a propagação da resistência destes microrganismos a cefalosporinas é bastante semelhante ao da resistência a quinolonas (Patel *et al.* 2011).

Na maioria dos países os fármacos de primeira linha normalmente utilizados são as cefalosporinas de largo espectro ceftriaxona (injetável) e o cefixime (oral). Contudo,

a suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* a ambos diminuiu em todo o mundo. O tratamento de dose única (400 mg) com cefixime tem sido preferido em muitos países, devido à facilidade e eficácia de uma única dose oral e porque até 2010 apenas existia evidência de falência terapêutica no Japão. Contudo, foram descritos dois casos de falência terapêutica com Cefixime em 2010 na Noruega, e três casos em 2011 no Reino Unido. Recentemente, foi encontrada uma estirpe de *N. gonorrhoeae* com alto nível de resistência à ceftriaxona (a última opção de primeira linha para tratamento empírico) (WHO 2012a).

1.1.7 Diagnóstico de infecção por *Neisseria gonorrhoeae*

Os critérios laboratoriais recomendados pela Organização Mundial de Saúde para confirmação do agente etiológico são: o isolamento em cultura de diplococos Gram-negativo, oxidase-positivo confirmados com a utilização da fermentação de açúcares (ou outro método de confirmação da espécie), ou a demonstração de DNA específico de *N. gonorrhoeae* em amostras clínicas por técnica de amplificação de ácidos nucleicos devidamente validada (WHO 2012b).

Métodos tradicionais

O diagnóstico laboratorial de gonorreia depende da identificação de *N. gonorrhoeae* no local infetado. Até final dos anos oitenta o diagnóstico laboratorial da gonorreia estava limitado à coloração de Gram e ao isolamento da bactéria. A coloração pela técnica de Gram é uma ferramenta rápida e tem sensibilidade comparável à cultura em homens com corrimento uretral. Assim, a coloração Gram de esfregaço do exsudado uretral é o método mais utilizado para o diagnóstico da gonorreia no homem sintomático, em função da sua sensibilidade e especificidade. Contudo, para as mulheres em função da presença de um ecossistema vaginal muito rico, a coloração Gram torna-se pouco sensível, sendo indicada a cultura de amostras do canal endocervical. Para amostras de locais extragenitais (onde a especificidade da coloração Gram pode estar

afetada pela presença de *Neisseria* comensal), é também indicada a cultura (Whiley *et al.* 2006).

O isolamento em cultura é sensível e específico para a detecção de *N. gonorrhoeae*, até à data, representa o *Gold standard* para o diagnóstico laboratorial. Adicionalmente ao seu baixo custo, a cultura possibilita a execução do antibiograma bem como a obtenção do organismo viável para investigação epidemiológica. Contudo, a cultura necessita da colheita de amostras invasivas, que precisam ser transportadas sob determinadas condições para manter o microrganismo viável. Além disso, o facto de *N. gonorrhoeae* ser um microrganismo muito exigente dificulta o seu isolamento (Hjelmevoll *et al.* 2006).

Métodos de Biologia molecular

As técnicas baseadas na pesquisa de ácidos nucleicos começaram a ficar disponíveis no mercado no início dos anos noventa. Estes incluem as técnicas de hibridação e as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT). As técnicas de hibridação de ácidos nucleicos utilizam sondas específicas de oligonucleótidos para hibridar diretamente em *N. gonorrhoeae* presente numa amostra. Os valores da sensibilidade e da especificidade destas técnicas demonstraram ser mais baixas que as da cultura.

As NAAT para detecção de *N. gonorrhoeae* são amplamente utilizadas para o diagnóstico de gonorreia. Utilizam principalmente a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e têm como alvo vários genes de *N. gonorrhoeae*. As técnicas de PCR são há cerca de dez anos o método de eleição para o diagnóstico de infeção por *Chlamydia trachomatis* nos laboratórios de Microbiologia. Existem algumas NAAT comerciais mas a grande maioria são técnicas preparadas *in-house*. As técnicas comerciais utilizam NAAT em multiplex, com detecção de *Chlamydia trachomatis* e *N. gonorrhoeae* em simultâneo. As NAAT *in-house* na sua maioria não utiliza tecnologia em multiplex.

Vantagens – Existem várias vantagens nas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT) para a deteção de *N. gonorrhoeae*. Uma das quais, maior sensibilidade em relação á cultura. A superior sensibilidade das NAAT torna-as particularmente apropriadas aos rastreios, permitindo o diagnóstico de infeções sintomáticas e assintomáticas, o que é crítico para o controlo da gonorreia (Whiley *et al.* 2006; Bignell 2009).

As amostras colhidas para realização de NAAT não necessitam que o organismo esteja viável para ser detetado, por isso, requer condições de transporte da amostra menos restritivas quando comparadas com as amostras colhidas para cultura.

As NAAT dão a possibilidade de utilizar amostras não invasivas, como a urina e exsudados colhidos pelo próprio doente. Isto é particularmente útil em locais onde não estão disponíveis serviços apropriados de saúde e para populações especiais, com restrições culturais ou religiosas, que sem esta oportunidade não fariam a colheita.

Desvantagens – As NAAT para deteção de *N. gonorrhoeae* têm algumas limitações. Estas incluem os problemas típicos associados à utilização de qualquer protocolo de NAAT, tais como custos elevados, contaminações, inibição da reação, necessidade de controlo de qualidade exigente e, a maior desvantagem atual, a ausência de informação sobre AMR. Existem limitações relacionadas, particularmente, com as sequências utilizadas como alvo para a deteção de *N. gonorrhoeae*, podendo gerar falsos positivos e falsos negativos. Isto acontece porque as sequências alvo estão presentes em certas espécies comensais de *Neisseria* ou ausentes em certas estirpes de *N. gonorrhoeae*.

Desafios mais comuns associados à utilização de NAAT

Os métodos que utilizam NAAT podem ser suscetíveis à inibição por substâncias que possam estar presentes nas amostras dos pacientes. Estas incluem, a gonadotrofina coriônica β – humana, cristais, hemoglobina e nitritos, podendo originar resultados falso negativos. Estes inibidores são comuns em amostras de urina e portanto são particularmente relevantes para a sensibilidade das NAAT na deteção de *N.*

gonorrhoeae. O problema pode ser resolvido com a utilização de um controlo interno (CI) de amplificação, que permite identificar quando a inibição ocorre (Whiley *et al.* 2008).

Existem vários estudos a investigar a utilização de técnicas moleculares para detetar a resistência de *N. gonorrhoeae* a antibióticos. Estes estudos examinaram os genes da PBP e os genes da *gyrase A*. Contudo, esta abordagem presentemente não é uma alternativa plausível aos métodos fenotípicos dos testes de sensibilidade aos antibióticos porque muitos mecanismos genéticos de resistência ainda não foram identificados.

Na opinião de Whiley *et al.* num estudo sobre testes de amplificação nucleica para *N. gonorrhoeae* realizado em 2006 o facto de as NAAT não permitir informação sobre a resistência antimicrobiana aos antibióticos não é razão para as excluir de métodos de rastreio para deteção de *N. gonorrhoeae*. Pelo contrário, aconselham um logaritmo de teste que seria melhorado se as amostras com resultados positivos nas NAAT fossem depois sujeitas a cultura para providenciar a informação antimicrobiana por métodos fenotípicos.

A elevada sensibilidade das NAAT permite que os ácidos nucleicos de organismos não viáveis depois de tratamento com antibiótico sejam detetados. Portanto, podem aparecer resultados positivos, se forem testadas amostras demasiado cedo após tratamento efetivo contra *N. gonorrhoeae*, resultando na administração adicional e desnecessária de antibiótico. Foi demonstrado que após terapia com sucesso para *N. gonorrhoeae*, as NAAT continuam a dar resultados positivos durante vários dias, mas o DNA de *N. gonorrhoeae* desaparece das amostras urogenitais no fim de duas semanas (Whiley *et al.* 2006).

Genes alvo para deteção de *N. gonorrhoeae*

Os genes alvo mais frequentemente utilizados para a deteção de *N. gonorrhoeae* incluem o gene *ccpB* do plasmídeo críptico pJD1, gene *opa*, gene *16S rRNA* e o pseudogene *porA*, entre outros. As sondas derivadas de oligonucleótidos do rRNA para

deteção de diferentes regiões da subunidade 16S do ribossoma, têm elevada sensibilidade e especificidade (Ho *et al.* 1992). Contudo, a técnica de PCR com este alvo de deteção (gene *16S rRNA*) demonstrou ter menor sensibilidade que as que utilizam os genes *opa* ou *porA* para a deteção de *N. gonorrhoeae* (Gurtler *et al.* 2012). Foi demonstrado que o gene *ccpB* do plasmídeo críptico pJD1 também está presente em outras *Neisseria* spp. e pode estar ausente em alguns isolados de *Neisseria gonorrhoeae*. (Whiley *et al.* 2004). Maze *et al.* em 2011 apresentou um estudo comparativo da deteção de *N. gonorrhoeae*, em amostras clínicas por técnica de PCR utilizando como alvo de amplificação o gene *opa* e o pseudogene *porA*. Nesse estudo uma das amostras foi positiva para o gene *opa* e negativa para o pseudogene *porA* e cultura, deixando a questão se se trataria de um falso negativo da técnica de PCR para o alvo *porA* ou de um resultado falso positivo da técnica de PCR com o alvo *opa*, por responder.

O pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae* é, graças à sua alta sensibilidade e especificidade, das sequências alvo mais utilizadas em técnicas de PCR realizadas *in-house*. Whiley *et al.* em 2006 investigou a utilização do pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae* como alvo para a técnica de PCR em tempo real em 636 amostras urogenitais e extragenitais e reportou sensibilidade e especificidade de 100 %. Sendo que esta técnica não demonstrou reações cruzadas com as 102 estirpes de *Neisseria* comensal.

Apesar da homologia do pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae* com o gene *porA* de *N. meningitidis* a técnica de PCR em tempo real utiliza as sequências alvo *porA* específicas de *N. gonorrhoeae* e não tem reações cruzadas com o DNA de *N. meningitidis*. A proteína PorA não é expressa em *N. gonorrhoeae* e por isso o pseudogene *porA* não está sob pressão imune. A porina PorA só é funcional em *N. meningitidis*, apesar do gene *porA* estar presente em *N. gonorrhoeae*, contém mutações que inativam as suas regiões promotora e codificante. As espécies comensais de *Neisseria* não demonstraram ter gene/pseudogene *porA* (Hjelmevoll *et al.* 2006).

Desafios relacionados com as sequências de *N. gonorrhoeae* utilizadas em NAAT

A variação entre as estirpes de *N. gonorrhoeae* e a contínua alteração de prevalência destas estirpes numa população pode ter um impacto significativo sobre o sucesso destas técnicas. Existe uma grande amplitude de estirpes de *N. gonorrhoeae* que exhibe variação genética considerável e não estão aleatoriamente distribuídas. Isto é, a sua distribuição varia geográfica e temporalmente e entre grupos de pacientes. Um exemplo disto foi disponibilizado por estudos onde demonstraram que algumas estirpes de *N. gonorrhoeae* não tinham o gene *cppB*, existindo assim potencial para resultados falso negativos (Lum *et al.* 2005). Vários estudos realizados na Austrália apresentaram resultados contraditórios em relação à ocorrência de estirpes de *N. gonorrhoeae* com a ausência do gene *cppB*, indicando que a incidência destas estirpes varia entre grupos de doentes, presumivelmente devido às diferenças no domínio dos subtipos de *N. gonorrhoeae* nestas populações. Isto demonstra que uma NAAT, numa dada população, num determinado período, pode ser, bem sucedida mas pode não refletir uma NAAT adequada para a utilização numa outra população de pacientes ou até mesmo na mesma população mas num período extenso de tempo.

Também já foram isoladas estirpes de *N. gonorrhoeae* com gene *porA* recombinante, causando pontualmente resultados falso negativos por técnica de PCR. Entre 2010 e 2011, foram identificados na Escócia três isolados de *N. gonorrhoeae* que não possuíam a sequência alvo do pseudogene *porA* (Eastick *et al.* 2012). O primeiro caso australiano de *N. gonorrhoeae* isolado de uma amostra clínica no qual o pseudogene *porA* de *N. gonorrhoeae* estava substituído pela sequência do gene *porA* de *N. meningitidis* foi detetado em 2011 (Whiley *et al.* 2011).

A maioria dos resultados falso positivos observa-se quando espécies comensais estão presentes na amostra colhida (Walsh *et al.* 2011), estas bactérias são pouco comuns nas amostras urogenitais, encontram-se frequentemente a colonizar a orofaringe e menos frequentemente o reto (WHO 2012b).

A reação cruzada deve-se ao elevado grau de homologia das sequências entre *N. gonorrhoeae* e as outras espécies de *Neisseria*. Existem duas fontes para esta homologia. Primeiro, os genomas de *N. gonorrhoeae* e *N. meningitidis* são bastante

semelhantes e pensa-se que tiveram um passado ancestral comum (Vazquez *et al.* 1993). Segundo, as espécies de *Neisseria* têm a capacidade de aquisição de DNA externo durante todo o seu ciclo de vida (Feavers & Maiden 1998).

Foram descritas reações cruzadas com os plasmídeos de *N. meningitidis*, *N. lactamica* e *N. subflava*, na utilização do gene *cppB* como alvo para detecção de *N. gonorrhoeae* (Ho *et al.* 1992), por isso deve ser posteriormente efetuada a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP) do DNA para confirmação da espécie.

Valor preditivo positivo (PPV) - A especificidade das NAAT são em geral elevadas, sendo a maioria superior a 98 %. Contudo, o seu valor preditivo positivo depende da população onde são utilizadas. O valor preditivo positivo pode ser inaceitável (< 90 %) em populações onde a prevalência de infeção por *N. gonorrhoeae* é baixa (Bignell & FitzGerald 2011). Se a especificidade de um teste for 99,5 %, então 0,5 % dos resultados positivos serão falsos positivos. Assim, se a prevalência na população for 1 %, metade dos casos positivos podem ser resultados falsos positivos, providenciando um valor preditivo positivo de 50 %. Em populações com muito baixa prevalência de infeção por *N. gonorrhoeae* (< 1 %) a especificidade destas técnicas não é perfeita, originando resultados falso positivos e consequentemente PPV inferiores a 90 % e obrigando a realização de testes confirmatórios. Esta proporção deve, portanto, ser sempre tida em consideração (Bignell & FitzGerald 2011). Por esta razão, é recomendado o emprego de um segundo alvo de detecção quando são utilizadas NAAT para diagnóstico de *N. gonorrhoeae* para confirmação dos casos positivos (CDC 2002; Bignell & FitzGerald 2011; NHS 2012). Também os rastreios merecem precauções à sua realização. É recomendada a realização de rastreios seletivos, apenas em populações onde o risco é elevado (Whiley *et al.* 2006).

A amostra de urina para detecção de *N. gonorrhoeae*

A urina utilizada para a detecção de *N. gonorrhoeae* pela técnica de PCR tem a vantagem de ser uma amostra de fácil obtenção, não invasiva. Este tipo de colheita é a mais indicada para rastreios de infeção por *N. gonorrhoeae* com NAAT, pelas razões já

apontadas mas também porque possibilita o reconhecimento de portadores assintomáticos. Contudo, nas mulheres a detecção de *N. gonorrhoeae* com NAAT na urina, dependendo do teste em particular, pode falhar em cerca de 25 % dos casos devido à ausência da bactéria na uretra. Por isso, o exsudado vaginal/cervical é a amostra mais sensível para a detecção de *N. gonorrhoeae* com NAAT nas mulheres, enquanto no homem a urina é ótima para detecção de *N. gonorrhoeae* com NAAT, permanecendo a amostra de eleição (WHO 2012b).

1.2 Justificação da tese

As infeções gonocócicas continuam a ser uma das maiores preocupações de saúde pública a nível mundial. Representam mundialmente cerca de 106,1 milhões de novos casos por ano em infeções sexualmente transmissíveis (WHO 2012b).

Com mais de 32 000 casos, a gonorreia foi a segunda infeção sexualmente transmissível mais frequentemente reportada na Europa em 2010 (ECDC 2012). Apesar de neste continente se viver uma situação menos grave que nos países em desenvolvimento, tanto a manutenção de práticas sexuais desprotegidas aliada à livre circulação de pessoas no espaço europeu como o grau de mobilidade a nível do planeta levam a que as IST clássicas e outras importadas surjam de modo regular (ECDC 2009).

Na União Europeia (EU) a gonorreia foi três vezes mais frequente nos homens que nas mulheres e mais de um quarto de todos os casos de gonorreia em 2010 (26 %) foi reportado em MSM (ECDC 2012).

O Reino Unido, a Letónia, a Irlanda e Malta têm as maiores taxas de gonorreia (> 10 /100 000 habitantes) na EU (ECDC 2012). As taxas mais baixas de gonorreia (< 5 por 100 000 habitantes) foram reportadas nos países do sul da Europa (Grécia, Espanha, Portugal), central e de leste (Bulgária, Roménia, Polónia, Eslovénia) mas também na Finlândia. Contudo, em Portugal, no Chipre, na Irlanda, na Finlândia, na Noruega e na Suécia o número de casos de gonorreia reportados, por cem mil habitantes, aumentou nos últimos três anos.

Apesar de Portugal apresentar, segundo os dados do relatório de vigilância de IST na Europa entre 1990-2010, baixas taxas de incidência de gonorreia (< 5 casos por 100 000 habitantes) o número de casos de gonorreia reportados entre 2006-2010 aumentou mais de 50% (ECDC 2012).

Existem duas tendências distintas relativamente a gonorreia na EU nas últimas duas décadas: 1) A diminuição do número de casos notificados por países com altas taxas de notificação de gonorreia, por exemplo Bulgária, Estónia, Letónia, República Checa e Roménia; 2) até 1999, a diminuição do número de casos e no início da década do ano 2000, o número total de casos notificados voltou a aumentar. As anteriores

elevadas taxas, observadas anteriormente nos países da Europa de Leste e Central, podem refletir o resultado do rastreio da população e numa notificação consistente por parte dos serviços de saúde. A diminuição do número de casos pode refletir a alteração nos sistemas de saúde (privatização) e o declínio na rotina de notificação que conduz a subnotificação e ao aumento substancial de infeções que permanecem sem ser diagnosticadas.

O relatório, do ECDC em 2012, de vigilância Europeu de IST na Europa entre 1990 e 2010 indica que a informação sobre IST é obtida de serviços especialmente dedicados (consultas IST) em vez de serviços de saúde generalistas. Além disso, muitos países obtêm informação através de vigilância sentinela, o que sugere que o número atual de casos notificados pode estar grosseiramente subestimado bem como muitos casos ficam por diagnosticar e, conseqüentemente, por notificar. Esta situação torna difícil a avaliação correta da situação epidemiológica na EU.

A informação epidemiológica sobre IST em Portugal é escassa (Health Protection Agency 2008; ECDC 2009), exceção feita para a infeção por HIV que é objeto de programa próprio, mas parece verificar-se um cenário análogo ao de outros países europeus, nomeadamente no tocante à distribuição das infeções mais relevantes nas grandes cidades (Costa *et al.* 2010).

O número de casos notificados em Portugal em 2010 foi de 89. Desde 2004 que o número de casos de infeção por *N. gonorrhoeae* diagnosticados tem vindo a aumentar atingindo em 2009 um valor máximo desde o início dos anos noventa com 114 casos notificados.

A situação atual em Portugal é a inexistência de dados epidemiológicos fiáveis sobre IST por vários motivos, entre eles a subnotificação, a maior tradição de procura das consultas privadas de ginecologia ou urgência generalista de hospitais em relação a serviços com consulta dedicada a IST. O número de casos reais de IST não é assim conhecido.

Em Portugal, o número de doentes em consultas sobre IST tem aumentado. Por outro lado, a resistência de *Neisseria gonorrhoeae* aos antibióticos tem sido relatada. Por estas razões pensa-se que, também em Portugal, o número de novos casos de IST

venha aumentando nos últimos anos. Os adolescentes e adultos jovens são geralmente os mais afetados, assim como aqueles que têm dificuldades de acesso aos cuidados de saúde. No entanto, em Portugal, conhece-se muito pouco sobre a prevalência de IST em grupos específicos.

A gonorreia demonstrou estar associada ao aumento da disseminação do HIV, assim como de outras IST.

A elevada prevalência do HIV, em Portugal, parece indicar que existem números elevados de outras IST. Em Portugal, pese embora o número absoluto de casos de HIV ser superior como consequência da transmissão heterossexual, é nas chamadas populações vulneráveis que se concentra o risco mais elevado de infeção, e é através delas que a infeção tende a ser transmitida. Os homens que fazem sexo com homens, tal como os trabalhadores do sexo e utilizadores de drogas constituem atualmente a população onde existe a chamada “epidemia concentrada” de infeções pelo HIV (Ministério da Saúde 2011). Provavelmente a gonorreia, tal como a infeção pelo HIV, segue a mesma tendência.

Sabe-se também que, em Portugal, fatores reconhecidos como responsáveis por uma maior incidência das IST, nos últimos anos, têm vindo a ganhar relevo, como, por exemplo, o aumento do número de viajantes, dos migrantes, dos comportamentos sexuais de risco e a deterioração das respostas das estruturas de saúde no controlo de IST (Ministério da Saúde de Portugal 2004).

Em 1887 foi criada em Portugal a primeira consulta de "Moléstias Syphiliticas e Venéreas" por D. Thomaz de Mello Breyner, no Hospital do Desterro. Em 1927 foi criado pelo decreto 14803 o Dispensário Central de Higiene Social de Lisboa e posteriormente foram criados serviços idênticos nos vários distritos do país. A extinção, na década de 80, dos dispensários centrais de Lisboa e Porto, constituiu um retrocesso na luta contra as doenças venéreas, porque não foram substituídos por serviços com características semelhantes (Instituto Camões 2006).

As pessoas com doenças sexualmente transmissíveis são observadas nas consultas de venereologia dos hospitais centrais e distritais, nas consultas de ginecologia, urologia e nos serviços de urgência.

Na literatura, até onde foi possível pesquisar, em bases de dados nacionais e internacionais, existem poucos estudos sobre a prevalência e detecção de *N. gonorrhoeae* com NAAT em Portugal, especialmente da população em estudo. À exceção do estudo realizado por Costa *et al.* em 2010 que também abordou a população de uma consulta de venereologia, os estudos encontrados sobre IST em Portugal foram abordados em populações como migrantes Africanos (Távora-Tavira *et al.* 2007) e adolescentes grávidas (Costa 2009; Costa *et al.* 2011). Não foram encontrados estudos nacionais que abordassem a avaliação de NAAT para a detecção de *N. gonorrhoeae*.

A implementação de NAAT no diagnóstico de infeção por *N. gonorrhoeae* permite um diagnóstico mais célere e sensível desta infeção que a cultura, assim como a utilização de amostras colhidas por meios não invasivos, como a urina. As colheitas de urina pela facilidade de obtenção facilitam a adesão a rastreios em populações onde se justifiquem, identificação de portadores assintomáticos e maior adesão de diagnóstico dos contatos sexuais, contribuindo para quebrar a cadeia de transmissão da gonorreia.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Deteção de *Neisseria gonorrhoeae* por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de urina de indivíduos que procuraram a consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria no primeiro semestre de 2011.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar a prevalência de *Neisseria gonorrhoeae* nos doentes em primeira consulta da consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria, durante o primeiro semestre de 2011;
2. Comparar duas técnicas de PCR na deteção de DNA de *Neisseria gonorrhoeae*;
3. Determinar a percentagem de portadores assintomáticos de infeção por *Neisseria gonorrhoeae* e de coinfeção com *Chlamydia trachomatis*;
4. Estudar associações do diagnóstico de infeção de gonorreia com fatores sociodemográficos e clínicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização da população em estudo

Foram estudadas 145 amostras de urina provenientes de utentes que foram observados na consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria em Lisboa no primeiro semestre de 2011. Foi colhida e estudada uma amostra de cada utente. Estas urinas foram colhidas para rastreio de infeção por *Clamidia trachomatis* no HSM e para deteção de *Neisseria gonorrhoeae* no IHMT – UNL.

Dos processos dos utentes foram obtidos os seguintes dados:

1. Sexo;
2. Idade;
3. Orientação sexual;
4. Diagnóstico prévio de Sífilis e de infeção por HIV, *Clamidia trachomatis*, *N. gonorrhoeae* e HPV;
5. Escolaridade;
6. Nacionalidade;
7. Número de parceiros sexuais nos últimos 6 meses;
8. Motivo da consulta.

2.2 Desenho do estudo

- A** Colheita/Conservação das amostras de urina
- B** Extração do DNA
- C** Amplificação e detecção de um fragmento de 132pb do pseudogene *porA* pela técnica de PCR em tempo real
- D** Amplificação de um fragmento de 390pb do gene *ccpB* do plasmídeo críptico pJD1 de *N. gonorrhoeae* pela técnica de PCR e detecção do produto amplificado por eletroforese
- E** Digestão enzimática do produto amplificado, pela técnica anterior, através da enzima de restrição *MspI* e detecção dos produtos de restrição (fragmentos 250 pb e 140 pb) por eletroforese - RFLP

2.2.1 Colheita/Conservação das amostras de urina

Os utentes colheram as amostras do primeiro jato de urina (10 – 30 ml) sem que tenham urinado pelo menos uma hora antes da colheita. As amostras foram centrifugadas a 1788.8 x g durante 45 minutos, o sobrenadante foi rejeitado e, após homogeneização, foram separadas alíquotas de 1,2 ml de cada sedimento. As alíquotas foram divididas em três replicados e conservadas a -20 graus °C até à extração, tendo sido estudadas no máximo até 60 dias após a colheita.

2.2.2 Extração do DNA

A extração do DNA total foi efetuada a partir dos sedimentos de urina, após o seu descongelamento, com o recurso ao kit comercial JetQuick (Blood and cell cultureDNA Spin Kit®, Genomed) de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizados 400µL do sedimento. A cada sedimento foram adicionados 3µL de uma diluição 10^{-5} de CI para funcionar como DNA molde (ver 2.2.3 controlo interno).

O primeiro passo da extração foi a digestão com proteinase K, que é uma protease isolada a partir de um fungo saprófito: *Tritirachium álbum*. Com alta especificidade para o substrato, a proteinase K cliva na extremidade carboxil dos aminoácidos inativando a atividade das nucleases durante a preparação do DNA. Após a adição do tampão de lise (K1) prosseguiu-se com a purificação do DNA e eliminação dos resíduos orgânicos utilizando o etanol para desnaturar/inativar a proteinase K e os tampões solventes orgânicos KX e K2. Seguiu-se a obtenção final do DNA após eluição com TE (tampão de eluição Tris-HCL) fornecido pelo fabricante.

2.2.3 Amplificação e deteção de um fragmento de 132pb do pseudogene *porA* por técnica de PCR em tempo real

Primers e Condições da técnica de PCR

As sequências dos *primers forward* e *reverse* utilizados para detetar um fragmento do pseudogene *porA* de *Neisseria gonorrhoeae* foram 5'-CGGTTTCCGTGCGTTACGA -3' e 5'-CTGGTTTCATCTGATTACTTTCCA -3', respetivamente. A sequência da sonda (TaqMan) para a identificação do produto amplificado do pseudogene *porA* foi 5'-FAM-AAGTAGCAGGCGTATAGGCGGACTVTGC-DB-3'. A amplificação teve lugar no termociclador RotorGene-3000 da QIAGEN®. Foi utilizada a mistura de reação comercializada Master Mix (2x) sensiMix™ Probe Kit adicionada dos *primers* na

concentração de 0,4 μ M e da sonda de 0,2 μ M. As condições de amplificação foram de um período de ativação da polimerase de 5 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, e 61°C durante 60 segundos. Foram adicionados 3,6 μ L de DNA extraído de cada amostra a 14,4 μ L de mistura de reação. Em cada série de amostras estudadas foram utilizados os seguintes controlos:

Controlo Positivo

Constituído por diluições em TAE de DNA extraído de uma estirpe de referência de *Neisseria gonorrhoeae* (ATCC3857).

Controlo Negativo

O DNA foi substituído por água desionizada esterilizada.

Controlo Interno

Para controlar a extração do DNA como também uma possível inibição da técnica de PCR foi utilizado um controlo interno (CI) de amplificação.

Para tal utilizou-se a seguinte sequência sintética de oligonucleótidos de 100pb como alvo de amplificação

5'GTGCTCACACCAGTTGCCGCGGAAAGTATGTGGAATGTTAACACACCCAC
CACACCCACACACGTGTTGATCAATTCGAGATGCGAGCTGCCAAGC-3'

As sequências dos *primers forward* e *reverse* para o CI foram 5'-GTGCTCACACCAGTTGCCGC -3' e 5'- GCTTGGCAGCTCGCATCTCG -3', respetivamente, sendo a sequência da sonda (TaqMan):

5'- ATTGTGTGG GTGTGGTGTGGGTGTGTGC -3' CY5/BHQ3

A concentração final por reação de cada *primer* foi de 0,2 μ M sendo a sonda de 0,1 μ M.

2.2.4 Amplificação de um fragmento de 390pb do gene *ccpB* do plasmídeo críptico pJD1 por técnica de PCR e detecção do produto amplificado por eletroforese

2.2.4.1 Primers e Condições da PCR

O alvo de amplificação na pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* por técnica de PCR foi um fragmento de 390 pb do gene *ccpB* do plasmídeo críptico, técnica baseada em Ho *et al.* (1992). As sequências dos *primers* utilizados foram:

HO1-5' GCTACGCATACCCGCGTTGC 3'

HO3-5' CGAAGACCTTCGAGCAGACA 3'

A mistura de reação de PCR foi constituída por:

- água desionizada estéril
- 1x tampão de reação da Taq 160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM tris HCL [pH 8,8], 0,1% tween-20) (Biotaq®, Bionline)
- 2 µM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Biotaq®, Bionline)
- 4 µM de desoxirribonucleotidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Amersham Pharmacia Biotech®)
- 0,5 µM de cada *primer*, HO1 e HO3 (Invitrogen®)
- 0,04 U de enzima Taq DNA polimerase (Biotaq®, Bionline)

À mistura de reação foram depois adicionados 5 µL de DNA extraído de cada amostra de urina, perfazendo um volume total de reação de 25 µL por tubo. Como controlo positivo utilizou-se o referido na técnica de PCR em tempo real e como controlo negativo, o DNA foi substituído por água desionizada esterilizada.

A amplificação foi efetuada no termociclador Eppendorf® (Mastercycler personal), com as seguintes condições de amplificação:

- 1 ciclo a 95°C durante 2 minutos
- 40 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 1 minuto, 74°C durante 30 segundos

No final, o termociclador mantém-se a 4°C para conservar o produto amplificado.

2.2.4.2 Visualização dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1× (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA; pH 8.3) ao qual se adicionou brometo de etídio na concentração final 0,5 µg/ml (Sigma®, EUA).

Uma vez polimerizado, o gel foi colocado numa tina de electroforese (Horizon® 11.14, Amersham Pharmacia Biotech) e mergulhado em tampão TAE 1×. Posteriormente, a 10 µl de produto de amplificação foi adicionado 3 µl de uma solução saturada de sacarose corada com azul de bromofenol 6 × DNA loading dye (0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.6]) (Fermentas, Reino Unido). A migração dos produtos de amplificação no gel foi realizada simultaneamente com um marcador de massa molecular de 500 pares de bases (pb) (Hiperladder V®, Bioline) com bandas regularmente espaçadas a partir dos 25 pb, tendo-se adicionado 5 µl de marcador. Após a aplicação dos produtos de amplificação e do marcador de massa molecular no gel, foi aplicada uma corrente eléctrica de 100 volts (V) durante 60 minutos. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados no transiluminador (Gel Doc XR®, Biorad) sob luz ultravioleta (UV), equipamento que permite a captação de imagem digital do gel exposto à radiação devido à emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado na cadeia de DNA.

Em cada análise foi sempre aplicado pelo menos um controlo positivo e outro negativo.

Um produto de amplificação foi considerado “provável positivo” para deteção de *N. gonorrhoeae* quando era visualizada uma banda correspondente ao fragmento de 390 pb. Estes resultados eram válidos com as condições de o controlo negativo não demonstrar bandas e o controlo positivo demonstrar a banda esperada após a amplificação.

2.2.5 Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição - RFLP

2.2.5.1 Digestão enzimática

Para a confirmação da especificidade dos produtos de amplificação “prováveis positivos” para *Neisseria gonorrhoeae* aqueles foram posteriormente submetidos a digestão enzimática.

A 10 µl do produto obtido pela técnica de PCR tendo como alvo de amplificação o gene *ccpB* foi adicionado 1x tampão da enzima e 5 U da enzima de restrição *MspI* (MBI Fermentas®), num volume total de reação de 20 µl. Esta solução foi incubada a 37°C em banho-maria durante a noite, após a incubação seguiu-se a visualização dos produtos desta digestão por eletroforese.

2.2.5.2 Visualização dos produtos de digestão

Os produtos de digestão foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 2%, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1× (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA; pH 8.3) e ao qual se adicionou brometo de etídio na concentração final 0,5 µg/ml (Sigma®, EUA).

Uma vez polimerizado, o gel foi colocado numa tina de electroforese (Horizon® 11.14, Amersham Pharmacia Biotech) e mergulhado em tampão TAE 1×. Posteriormente, a 10 µl de produto de digestão foi adicionado 3 µl de uma solução saturada de sacarose corada com azul de bromofenol 6 × DNA *loading dye* (0,03% azul de bromofenol, 0,03% xileno cianol FF, 60% glicerol, 60 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 7.6]) (Fermentas, Reino Unido). A migração dos produtos de digestão no gel foi realizada simultaneamente com um marcador de massa molecular de 500 pares de bases (pb) (Hiperladder V®, Bioline) com bandas regularmente espaçadas a partir dos 25 pb, tendo-se adicionado 5 µl de marcador. Após a aplicação dos produtos de digestão e do marcador de massa molecular no gel, foi aplicada uma corrente eléctrica de 100 volts (V) durante 60 minutos. Os fragmentos de DNA resultantes da digestão foram

visualizados no transiluminador (Gel Doc XR®, Biorad) sob luz ultravioleta (UV), equipamento que permite a captação de imagem digital do gel exposto à radiação devido à emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado na cadeia de DNA.

Em cada análise foi sempre aplicado pelo menos um controlo positivo e outro negativo.

As amostras foram consideradas positivas quando se observavam duas bandas, uma de 140 pb e outra de 250 pb.

2.3 População e amostragem

Para o tamanho da amostra possibilitar o estudo transversal dos pacientes infetados com *Neisseria gonorrhoeae* o cálculo da amostra foi efetuado pela fórmula de *Wald* para um nível de confiança de 95% e um erro de previsão de 3,3%. Determinou-se então que para qualquer tipo de prevalência esperada seriam necessárias cerca de 142 amostras (ver cálculos). De acordo com um estudo epidemiológico e laboratorial sobre IST em adolescentes, com recurso a utilização de NAAT, realizado por João Borges da Costa (2009a), as infeções por *N. gonorrhoeae* apresentaram uma prevalência de 4,2%, tendo-se utilizado este valor para o cálculo de amostragem a usar no presente estudo.

Cálculo do tamanho da amostra:

$$n \geq \lceil Z^2 p^* (1-p^*) / \Delta^2 \rceil \text{ (Gonçalves 2011)}$$

$$p^* = 0,042 \text{ (prevalência do estudo piloto 4,2\%)}$$

$$Z = 1,96 \text{ (para um coeficiente de confiança de 95\%)}$$

$$\Delta = 0.033 \text{ (para um erro de previsão de 3,3\%)}$$

$$n \geq \lceil 1.96^2 \times 0.042 \times 0.96 / 0.033^2 \rceil \cong \lceil 142.23 \rceil = 142$$

2.4 Critérios de inclusão

Foram incluídas no estudo 145 amostras de urina dos utentes observados na consulta de venereologia do Hospital de Santa Maria (HSM) no primeiro semestre de 2011 que realizaram o rastreio de infeção por *Clamidia trachomatis*. O rastreio foi proposto a todos os doentes, independentemente do motivo da consulta.

No período do estudo não houve doentes que recusassem o rastreio.

2.5 Tratamento e análise dos dados

O tratamento e a análise dos dados foram efetuados através do *software* de tratamento de dados estatísticos IBM SPSS® *Statistics* (Statistical package for the social sciences, versão 20, SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

Além da análise exploratória e estatística descritiva dos dados, foram efetuados alguns testes de hipóteses, com uso de nível de significância de 5 %. Na análise da independência de duas variáveis qualitativas ou comparação de proporções em grupos independentes, utilizou-se o teste do Qui-quadrado de *Pearson* ou, alternativamente, o teste exato de *Fisher* quando alguma das frequências esperadas foi inferior a 5. Quando foram encontradas associações significativas, o phi (ϕ) também foi utilizado. Na análise das variáveis ordinais ou quantitativas contínuas foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney*.

3 RESULTADOS

3.1 Estatística descritiva da população e variáveis estudadas

A população estudada foi constituída por 80 % (116/145) de homens e 20 % (29/145) de mulheres.

A média de idades foi de 32,01 anos, com um desvio padrão igual a 12,746 e com um mínimo de 14 anos e um máximo de 81 anos.

Em 64,1 % dos casos (93/145) a nacionalidade dos utentes era Portuguesa, seguindo-se em frequência a nacionalidade dos países de língua oficial portuguesa: Brasil 10,3 % (15/145), Angola 6,2 % (9/145) e Cabo Verde 3,4 % (5/145).

Em relação á orientação sexual 86,2 % (125/145) foram utentes heterossexuais e 13,8 % (20/145) MSM.

	Homens	Mulheres	Total
	n = 116 (80 %)	n = 29 (20 %)	n= 145
Idade média	32,5	30,2	32,0
País nascimento			
Portugal	71	22	93
Outro	45 (38,8 %)	7 (24,1 %)	52 (36,1 %)
Orientação sexual			
MSM	20 (13,8 %)		
Heterossexuais	96	29	125

Tabela 1. Estatística descritiva da população

No nível de escolaridade, os quatro níveis mais frequentes (figura 3) foram licenciados 24,1 % (35/145), 12º ano 19,3 % (28/145), 9º ano 17,2 % (25/145) e 4º ano 11,7 % (17/145). A média de anos de escolaridade foi de 10,60 ($s = 4,020$, $n = 143$).

A média de parceiros nos últimos 6 meses foi de 1,76 % ($s = 1,340$), com um mínimo de 0 e um máximo de 10. O valor estatístico da moda para esta variável foi um parceiro nos últimos 6 meses, conforme descrito por 59,31 % (86/145) dos pacientes.

Foram referidos antecedentes de IST por 24,5 % (35/145) dos utentes, pelo contrário 75,5 % (108/145) dos pacientes não referiram IST prévia. Sendo que em 1,4 % dos casos (2/145) essa informação foi omissa.

Dos utentes estudados, 4,83 % eram HIV positivos (7/145).

No que diz respeito ao que motivou a consulta, o motivo mais frequente foi “condiloma”, correspondendo a 26,9 % (39/145) dos casos estudados, seguida em frequência por “corrimento uretral/cervical” (20 %, 29/145), “referenciação de parceiro” (10,3 %, 15/145), “herpes genital”, (9,7 %, 14/145) e “balanite” (9 %, 13/145) (Figura 1).



Legenda: 1- condiloma; 2- corrimento uretral/cervical; 3- sífilis primária; 4- sífilis secundária; 5- sífilis latente; 6- monitorização VDRL; 7- herpes genital; 8- molusco contagioso; 9- rastreio IST; 10- referenciação de parceiro; 11- balanite; 12- HIV; 13- manchas genitais; 14- líquen escleroso; 15- uretrite/artrite; 16- abscesso genital; 17- dor testicular; 18- candidose

Figura 4: Distribuição da população em estudo pelo motivo que originou a consulta

3.1.2 Resultados Laboratoriais

Foi detetado DNA de *Neisseria gonorrhoeae* em 5,5% dos utentes estudados (8/145) pelas duas técnicas utilizadas no estudo (figuras 5 e 7).

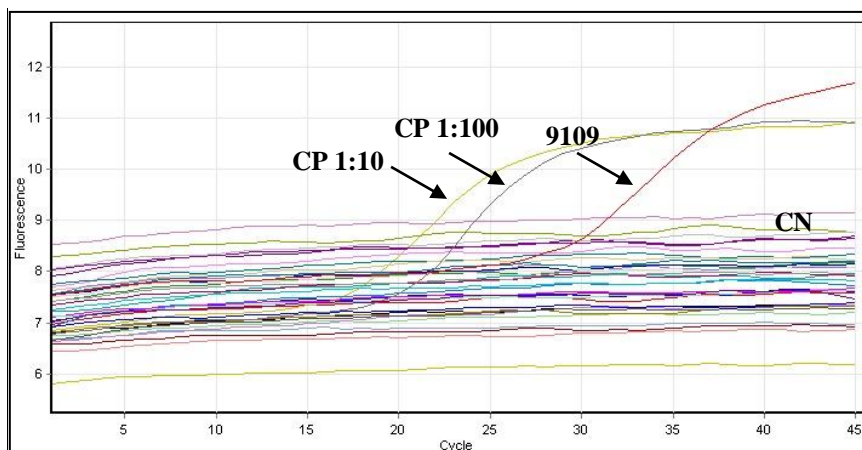


Figura 5: Gráfico das curvas de amplificação resultantes da emissão de fluorescência pelos produtos amplificados por técnica de PCR em tempo real. CP1:10- controlo positivo *N. gonorrhoeae* diluição de 1:10, CP1:100- controlo positivo *N. gonorrhoeae* diluição de 1:100, CN- controlo negativo, 9109- amostra de doente.

Não se verificou inibição de amplificação pelo CI em nenhuma das amostras testadas por técnica de PCR em tempo real (figura 6).

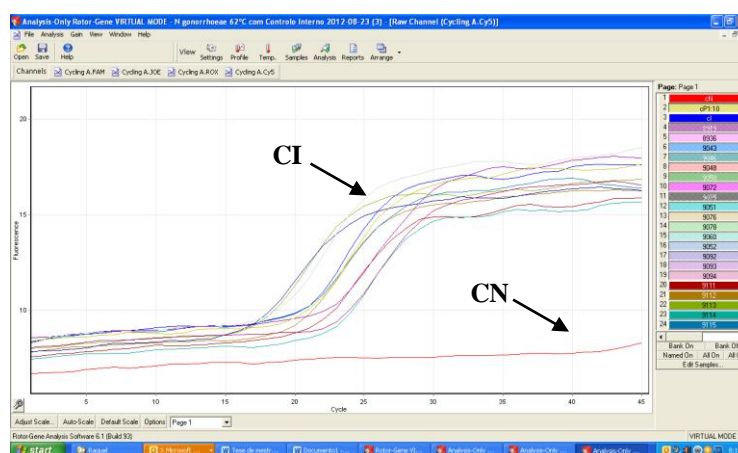


Figura 6: Gráfico das curvas de amplificação resultantes da emissão de fluorescência pelo produto amplificado (controlo interno) por técnica de PCR em tempo real

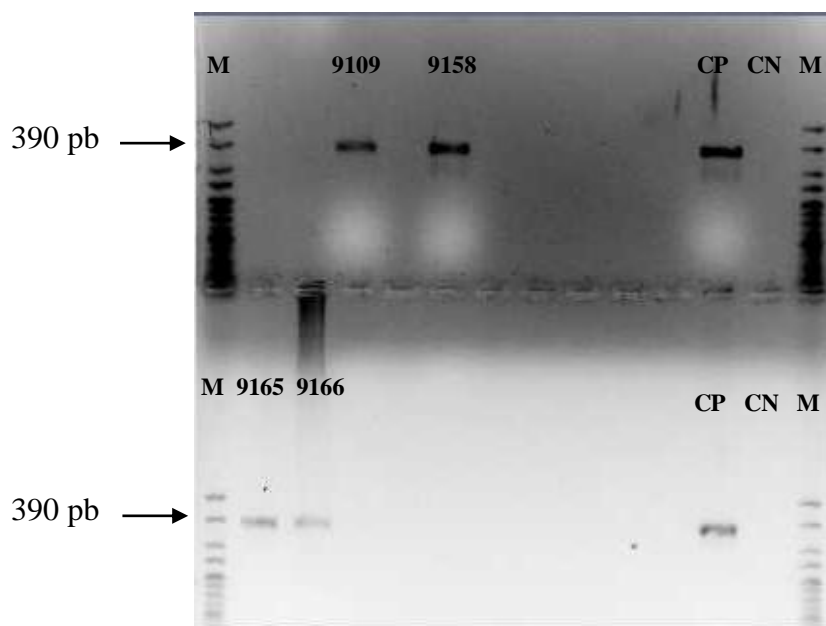


Figura 7: Gel de agarose com visualização das bandas de 390 pb resultantes da amplificação de um fragmento do gene *ccpB* do plasmídeo críptico pJD1 de *Neisseria gonorrhoeae*, após exposição a luz UV. CP- controlo positivo, CN- controlo negativo, M- marcador de pesos moleculares (HyperLadder V®, Bioline), 9109; 9158; 9165, 9166 - amostras de doentes.

A confirmação da espécie (*N. gonorrhoeae*) foi efetuada em 100 % (8/8) dos casos positivos pelas técnicas de PCR, com a técnica de RFLP pela visualização das bandas de 250 pb e 140 pb (figura 8).

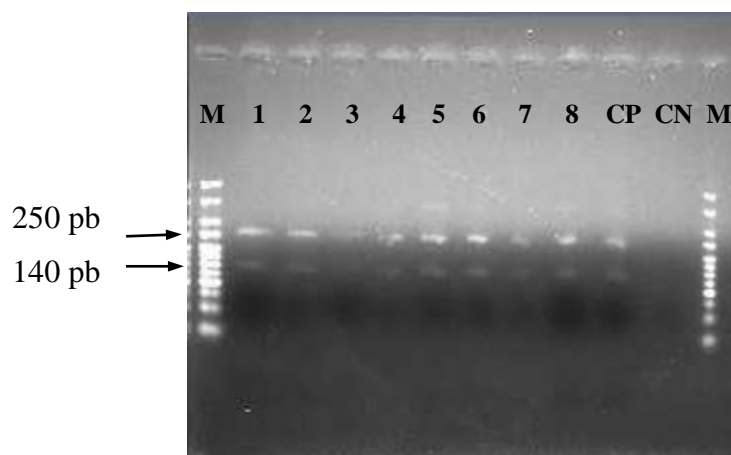


Figura 8: Gel de agarose com visualização das bandas de 250 pb e 140 pb resultantes da digestão, com a enzima de restrição *MspI*, do fragmento do gene *ccpB* do plasmídeo críptico pJD1 de *Neisseria gonorrhoeae* amplificado, após exposição a luz UV. CP - controlo positivo, CN - controlo negativo, M - marcador de pesos moleculares (HyperLadder V®, Bioline), 1 a 8 – amostras positivas.

3.1.3 Infecção por *Neisseria gonorrhoeae*

Metade dos casos de gonorreia identificados (50 %, 4/8), observaram-se no grupo etário entre os 25-34 anos de idade e um quarto dos casos entre os 20-24 anos (figura 9).

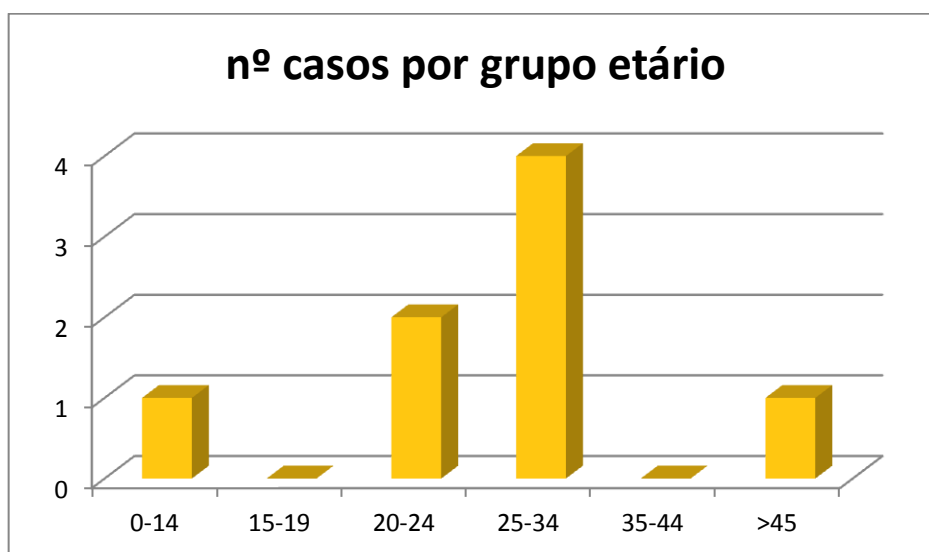


Figura 9: Distribuição do número de casos de gonorreia por grupo etário.

Foram detetados, pelas técnicas de PCR, neste estudo oito casos de infecção por *N. gonorrhoeae* nos 145 utentes estudados.

A coinfeção com *Chlamydia trachomatis* foi detetada em 1,4 % dos casos (2/145).

A percentagem de casos assintomáticos de infecção por *N. gonorrhoeae* foi 12,5 % (1/8).

Dos oito casos de infecção por *N. gonorrhoeae* detetados pelas técnicas de PCR utilizadas neste estudo, somente seis fizeram exame cultural do exsudado uretral, sendo que um dos resultados foi inconclusivo.

Nos cinco casos em que se obteve resultado do exame cultural do exsudado uretral, um não foi concordante com o resultado das NAAT tendo sido negativo (tabela 1).

Casos positivos	PCR <i>porA</i> Tempo Real	PCR <i>ccpB</i>	Cultura
8857	+	+	+
9095	+	+	Não fez
8988	+	+	+
9109	+	+	+
9158	+	+	+
9165	+	+	-
9166	+	+	Inconclusivo
9199	+	+	Não fez

Tabela 2: Resultados da pesquisa de *Neisseria gonorrhoeae* pelas diferentes técnicas de detecção/identificação.

Nos casos em que foi identificada *N. gonorrhoeae* no exame cultural (4/8), 75 % (3/4) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, sendo que três estirpes eram resistentes a tetraciclina; duas das quais também apresentaram resistência a penicilina (50 %, 2/4), tendo uma destas apresentado β – lactamases (25 %, 1/4) (figura 8).

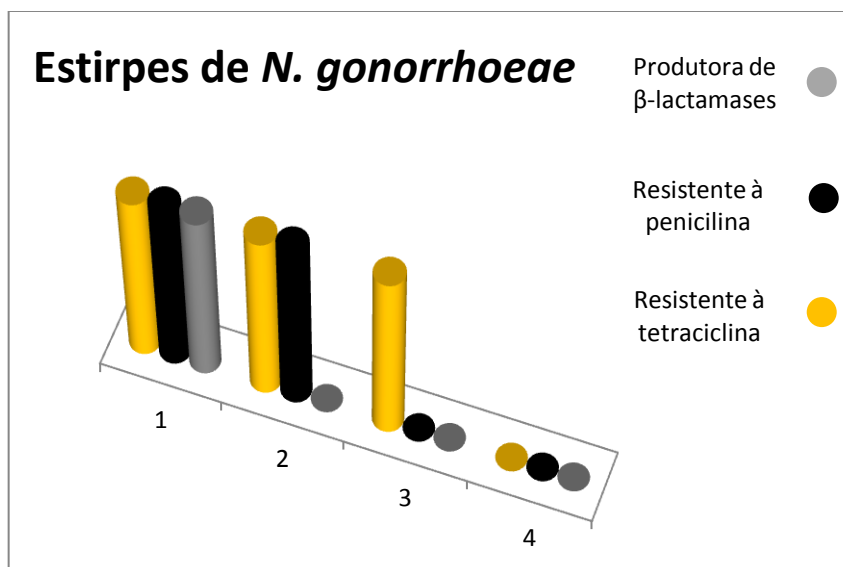


Figura 10: Resistências das estirpes isoladas.

Um doente, que efetuou tratamento anterior à consulta com ciprofloxacina e doxiciclina, apresentou no exame cultural resistência à penicilina e tetraciclina.

Os doentes com informação clínica de uretrite foram tratados com ceftriaxona 250 mg/IM + 1 g azitromicina *per os* e um doente que tinha suspeita de sífilis medicado com penicilina. Este último doente, foi convocado para nova consulta após a detecção de *Neisseria gonorrhoeae* pelas técnicas de PCR efetuadas neste estudo (tabela 3).

Doente	Cultura do exsudado	Resistência	<i>Clamýdia trachomatis</i> (PCR urina)	Tratamento anterior à consulta	Informação Clínica	ceftriaxona 250mg/IM + 1g azitromicina	Convocado para nova consulta
1	Positivo	penicilina, tetraciclina. com β -lactamases	Negativo	Não	Suspeita de S. de Reiter. Uretrite e artrite	Sim	Não
2	Positivo	tetraciclina	Negativo	Não	Uretrite Corrimento	Sim	Não
3	Positivo		Positivo	Não	Uretrite Corrimento	Sim	Não
4	Positivo	penicilina, tetraciclina	Negativo	ciprofloxacina doxiciclina	Uretrite Corrimento	Sim	Não
5	Negativo		Negativo	Não	Uretrite Corrimento	Sim	Não
6	Inconclusivo, Colheita incorreta		Negativo	Não	Uretrite Corrimento	Sim	Não
7	Não fez		Positivo	Não	Uretrite Corrimento	Sim	Não
8	Não fez		Negativo	Não	Úlcera, hipótese de sífilis	Não (fez penicilina)	Sim

Tabela 3: Dados dos doentes com identificação de *Neisseria gonorrhoeae* por técnica de PCR

3.2 Pesquisa de associações entre a infecção por *Neisseria gonorrhoeae* e as variáveis sociodemográficas e clínicas

A infecção por *Neisseria gonorrhoeae* detetada neste estudo foi significativamente mais frequente nos indivíduos com antecedentes de IST ($p = 0,032$ no teste exato de Fisher (Anexo 2).

Sendo também significativamente mais frequente nos indivíduos que recorreram à consulta por queixas de corrimento ($X^2 = 16,01$; $p < 0,0001$; $\phi = v = 0,33$ (Anexo 2).

Foi reportado mais de um parceiro sexual nos últimos seis meses em 40 % da população estudada (58/145). O número de parceiros nos últimos 6 meses foi significativamente superior nos doentes com diagnóstico de infecção por *N. gonorrhoeae* (MW:U = 284,5; $p = 0,01$) (Figura 10) (Anexo3).

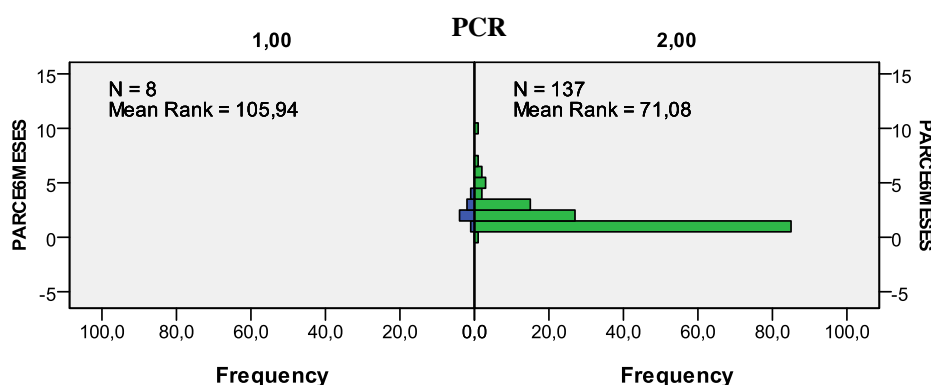


Figura 11: Amostras Independentes no Teste U de Mann-Whitney

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas restantes variáveis nominais (sexo; orientação sexual; diagnóstico prévio de gonorreia, clamidíase, sífilis ou infecção pelos vírus HIV, hepatite C e papiloma; nacionalidade e motivo da consulta) entre os doentes estudados ($n = 145$). Não foi igualmente observada diferença estatisticamente significativa entre doentes com e sem infecção por *Neisseria gonorrhoeae* detetada pela nossa técnica na distribuição de idades e anos de escolaridade.

4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1 Considerações gerais

A identificação dos casos de gonorreia, a sua notificação e o tratamento dos parceiros sexuais são cruciais para a redução de novos casos de infeção (Choudhury *et al.* 2006). A consulta de venereologia é um dos maiores contribuintes para a deteção das infeções por *N. gonorrhoeae* (Costa *et al.* 2010). Sendo escassos os dados acerca desta infeção em Portugal, o presente estudo permitiu aprofundar a informação sobre a prevalência da infeção por *N. gonorrhoeae* em grupos de maior risco de aquisição de gonorreia, nomeadamente utentes da consulta de venereologia, e sobre o uso das NAAT para a sua deteção.

4.2 Prevalência de infeção por *N. gonorrhoeae* na população estudada

A prevalência de infeções por *N. gonorrhoeae* determinada neste estudo (5,5 %) encontra-se ligeiramente acima da prevalência (2,4 %) determinada num estudo realizado em 2007 com uma população da consulta de venereologia na área de Lisboa (Costa *et al.* 2010). Esta discrepância pode dever-se á utilização no corrente estudo de NAAT para a deteção de *N. gonorrhoeae* na urina. As técnicas utilizadas no estudo realizado por Costa foram a microscopia do exsudado uretral em indivíduos do sexo masculino com sintomas de uretrite e a cultura no caso das mulheres. No entanto, a prevalência de gonorreia na consulta de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) do Centro de Saúde da Lapa entre 2009 e 2010 foi de 4,5 %. Nessa consulta a percentagem de homens foi de 63,4 % e a de mulheres 36,6 %, sendo a prevalência de 6,1 % nos homens e 1,8 % nas mulheres (Santo & Azevedo 2011). O facto do presente estudo englobar uma menor percentagem de mulheres (20 %) pode ter incrementado a prevalência.

Sabe-se que a infeção por *N. gonorrhoeae* tende a ser mais comum em homens (ECDC 2012), e isso tornou-se evidente em todos os estudos que foi possível pesquisar.

Contudo, isto pode dever-se ao fato de os homens terem maior probabilidade de experienciar sintomas e consequentemente irem a consulta fazer testes de diagnóstico e receber tratamento. Neste estudo isso foi notório, tendo sido observado 116 indivíduos do sexo masculino e apenas 29 indivíduos do sexo feminino.

Neste estudo o grupo etário entre os 25-34 anos de idade foi aquele com maior número de indivíduos, no qual foi observado 50 % dos casos de gonorreia (4/8) e o segundo maior grupo com gonorreia diagnosticada foi dos indivíduos com idade entre 20-24 anos (2/8). Semelhante distribuição, por categoria de idades, foi mencionada no relatório de vigilância do ECDC 2012 na Europa.

Foram encontradas associações entre a infeção por *N. gonorrhoeae* e três das variáveis estudadas. Os antecedentes de IST e o número de parceiros sexuais são dois fatores clássicos de risco para IST. Verificou-se a média aumentada do número de parceiros sexuais nos últimos 6 meses em doentes com gonorreia, tal como no estudo realizado por Costa em 2009a e constatou-se que a infeção por *N. gonorrhoeae* foi mais frequente em indivíduos com diagnóstico prévio de IST. Também ficou demonstrado que a uretrite/corrimento é um sinal frequente de infeção por *Neisseria gonorrhoeae*.

A percentagem de diagnóstico prévio de IST deste estudo (24,5 %) apresentou-se semelhante á encontrada no estudo realizado por Costa *et al.* 2010 (27,9 %).

A infeção por *N. gonorrhoeae* é frequentemente concomitante com a infeção por *Chlamydia trachomatis* (Gewirtzman 2011), neste estudo a percentagem de coinfeção com estes dois agentes bacterianos foi de 1,4 % próxima à prevalência descrita por Costa 1,2 % em 2009a.

A percentagem de portadores assintomáticos de *N. gonorrhoeae* no estudo (12,5 %) situou-se próximo da estimativa de casos assintomáticos (10 %) de infeção por *N. gonorrhoeae* em homens, apontada por MacDonald *et al.* em 2011.

As IST, que não o HIV, são alvo de subnotificação em Portugal. Entre 2009 e 2010 a consulta de DST do Centro de Saúde da Lapa notificou 174 casos de gonorreia. Quando comparados estes dados com o relatório de vigilância do ECDC 2012, constata-

se que, só por si, aquela consulta seria responsável por 86 % dos casos notificados em Portugal. Portanto, é claramente evidente a falta de notificação desta infeção no nosso país.

Apesar da queda de incidência da gonorreia na maior parte dos países Europeus desde os anos 80, nos últimos três anos foram registados aumento do número de casos no Chipre, Finlândia, Irlanda, Portugal, Noruega e Suécia. Esta situação no caso particular de Portugal pode estar associada a um passado com níveis ainda maiores de subnotificação.

4.3 Gonorreia & HIV

A gonorreia, representa um cofator de risco acrescido para a aquisição da infeção pelo HIV (Cohen *et al.* 1997; Fleming & Wasserheit 1999), tendo sido considerado um útil marcador de comportamentos sexuais de risco (Rice *et al.* 1991). A coinfeção HIV/*N. gonorrhoeae* é frequente, podendo conduzir a sérias dificuldades no controlo da infeção pelo HIV. Estas são as causas pelas quais faz parte das recomendações do CDC desde 2008 a pesquisa de outras IST em pessoas diagnosticadas com HIV e vice-versa (CDC 2008). Também deve ter-se em consideração que o subgrupo de MSM tem maior risco de infeção pelo HIV e outras IST, nomeadamente a gonorreia (CDC 2010b).

Não foram encontradas evidências, neste estudo, de associações entre a infeção pelo HIV e a infeção por *N. gonorrhoeae*.

Num estudo realizado por Costa *et al.* (2010) com doentes da consulta de DST do Centro de Saúde da Lapa, a percentagem de indivíduos com infeção pelo HIV (9 %) foi superior à deste estudo (4,8%), tal como a percentagem de MSM 39 % contra 13,8 % registados no presente estudo. De acordo com os dados do relatório e vigilância do ECDC em 2012 não existem dados discriminatórios do número de casos de gonorreia em MSM para Portugal, mas a percentagem média Europeia é de 26 %.

Em resposta á epidemia da infecção pelo HIV, muitos MSM adotaram o uso consistente do preservativo para o sexo anal. O uso do preservativo contribuiu para diminuição marcada da incidência de IST por bactérias e do HIV. A frequência de comportamentos sexuais de risco, de IST bacterianas e de HIV diminuíram substancialmente desde 1980 até meados dos anos noventa nos MSM. Contudo, desde essa altura verificou-se o aumento da frequência de gonorreia, sífilis e infecções por *Chlamydia trachomatis* bem como a frequência de relatos de comportamentos sexuais de risco em MSM (CDC 2010a; CDC 2010b).

4.4 Diagnóstico de gonorreia com NAAT

A propensão das espécies de *Neisseria* alterar o seu genoma através da aquisição ou perda de material genético tem demonstrado gerar resultados falsos positivos e falsos negativos (Goire *et al.* 2008; Golparian *et al.* 2012; Whiley *et al.* 2011) quando as amostras são testadas com NAAT.

A utilização de NAAT para a deteção de *Neisseria gonorrhoeae* pode originar resultados falsos negativos (Goire *et al.* 2008), uma vez que se sabe que existem subtipos desta espécie com alterações das sequências alvo utilizadas por algumas daquelas técnicas para a sua deteção. Estes subtipos de *N. gonorrhoeae* existem em zonas geográficas específicas, de distribuição temporal e entre grupos de doentes (Whiley *et al.* 2011). Neste estudo, as estirpes isoladas não apresentavam alterações das sequências alvo utilizadas (*porA* e *ccpB*) para a deteção de *N. gonorrhoeae*, uma vez que não surgiram resultados negativos por técnica de PCR nos casos em que o exame cultural, de pesquisa de *N. gonorrhoeae*, foi positivo.

Os resultados falsos positivos têm essencialmente origem em NAAT realizados em amostras extra urogenitais. As amostras de exsudados faríngeos e retais são as mais problemáticas devido, principalmente, á reação cruzada com espécies comensais de *Neisseria*, nomeadamente *N. lactamica*, *N. subflava*, *N. cinérea*, *N. flavescens* e *N. sicca* (Ho *et al.* 1992; Whiley *et al.* 2006). No presente estudo foram utilizadas amostras de urina, o que reduz a probabilidade da amostra conter espécies comensais de *Neisseria*.

Além disso, não foram encontrados resultados falsos positivos, uma vez que todas as amostras positivas foram testadas por duas técnicas de PCR com alvos de detecção diferentes e posteriormente foi realizada a confirmação da espécie pela técnica de RFLP.

Ambas as NAAT demonstraram boa sensibilidade e especificidade, relativas à população em estudo, uma vez que não foram encontrados resultados falsos positivos nem falsos negativos. Todas as amostras com o exame cultural positivo foram também positivas com as técnicas de PCR. Um caso em que o exame cultural não identificou *N. gonorrhoeae* esta foi detetada pelas técnicas de PCR utilizadas neste estudo.

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, concluiu-se que as técnicas de PCR, tendo como alvo de amplificação o pseudogene *porA* e o gene *ccpB*, apresentaram resultados satisfatórios, podendo ser assim adequadas para o diagnóstico de gonorreia em população de baixa prevalência (<10 %), como é o caso de Portugal, tendo-se confirmado a superior sensibilidade das NAAT relativamente à cultura.

O rastreio permite a monitorização da prevalência – uma forma de informação da vigilância – e desempenha um importante papel na deteção de casos de infeção por *N. gonorrhoeae*. O rastreio de infeção por *N. gonorrhoeae* com o recurso a NAAT a partir de amostras de urina ou exsudado vaginal realizado pela própria mulher é aconselhado pelo CDC (2012b) quando se trata de grupos de risco onde as condições de colheita, de amostras mais invasivas, seja impraticável, como é exemplo instalações não clínicas; adolescentes e outras pessoas relutantes em fazer o exame genital e para a prova de cura. Autores como Bignell e Spigarelli em 2006 e Fang em 2008 (citados em Costa 2009, pp. 108) defenderam que os testes não invasivos permitem uma maior adesão dos adolescentes aos rastreios, além disso são uma importante ferramenta para a deteção de portadores assintomáticos de *Neisseria gonorrhoeae*.

4.5 Resistência da *Neisseria gonorrhoeae* aos ATM nas amostras estudadas

A gonorreia continua uma preocupação clínica devido às complicações e sequelas adversas a longo prazo nas mulheres e ao aumento da prevalência de estirpes resistentes aos antibióticos. O desenvolvimento da diminuição da incidência de gonorreia contrasta com o aumento da prevalência de estirpes de *N. gonorrhoeae* produtoras de penicilinas e resistentes a tetraciclina. Com o aparecimento de resistência às fluoroquinolonas no sudoeste asiático e posteriormente nos EUA entre 1990-2000, o CDC de Atlanta deixou de recomendar, desde 2007, a sua utilização para o tratamento da gonorreia (CDC 2007). Esta situação tornou as cefalosporinas o único antibiótico disponível, recomendado para o tratamento desta infeção. Para permitir a modificação das recomendações terapêuticas atempadamente e prevenir a disseminação em larga escala de estirpes resistentes, é de grande importância vigiar a suscetibilidade de estirpes de *N. gonorrhoeae* isoladas na Europa.

Foi evidenciado, em laboratórios nos EUA, durante o período de 2006 – 2011 isolados de *N. gonorrhoeae*, a partir de exsudados uretrais, com suscetibilidade diminuída à cefixime (cefalosporina). Relatórios Europeus têm descrito doentes com infeções não complicadas que não curaram com os 400 mg orais de cefixime (CDC 2012a) recomendados. Duynhoven em 1999 refere no seu estudo sobre “A epidemiologia de *Neisseria gonorrhoeae* na Europa” que em Portugal se verificou um aumento dramático de estirpes resistentes às tetraciclina de 4 % em 1991 para 11 % em 1992, expandindo-se para 52 % em 1994. No presente estudo, as estirpes isoladas apresentaram resistência a penicilina em 25 % dos casos, 37,5 % a tetraciclina e 12,5 % foram produtoras de β - lactamases.

Tapsall em 1999 (citado por Otero *et al.* 2002, pp. 124) descreve como em Sidney na Austrália os isolamentos de estirpes resistentes eram no início esporádicos e com uma ampla diversidade fenotípica e que posteriormente este padrão se alterou, aumentando a prevalência de estirpes resistentes, as quais pertenciam a poucos fenótipos. Fazendo o paralelismo com o nosso país é de grande importância monitorizar as resistências e sensibilidades diminuídas das estirpes de *N. gonorrhoeae* aos antibióticos. Por outro lado, devemos recordar que as doenças de transmissão sexual são

um problema de caráter internacional, onde a facilidade de viajar desempenha um papel primordial na disseminação destas doenças, pelo que é possível o rápido aparecimento e estabelecimento de estirpes resistentes em zonas onde não existiam. Atualmente a resistência às fluoroquinolonas é um problema emergente a nível mundial, e o CDC não recomenda o seu uso em áreas com alta prevalência de estirpes resistentes, especialmente na população de MSM onde aquela é mais frequente e em pessoas com antecedentes de viagens a regiões com alta prevalência destas estirpes (CDC 2007).

4.6 Limitações do estudo

Este estudo tem limitações que não permitem qualquer generalização dos resultados com respeito às associações significativas, sendo válidas apenas para a população estudada. A população estudada não é aleatória nem representativa da população portuguesa, uma vez que neste estudo a percentagem de homens é muito superior à percentagem de mulheres. A amostragem foi de conveniência, contudo os resultados foram semelhantes aos de outros estudos sobre IST.

Os resultados não divergiram das tendências descritas para estas infeções, como a incidência aumentada de *Neisseria gonorrhoeae* nos doentes mais jovens ou a resistência, mediada por plasmídeo, à penicilina e às tetraciclinas que aumentou na Europa (Herida *et al.* 2004).

A relevância deste estudo, apesar das limitações, deve-se á escassez de estudos em Portugal sobre IST e especificamente sobre deteção de infeções por *N. gonorrhoeae*.

4.7 Perspetivas futuras

Seria importante no seguimento deste estudo a determinação da prevalência de estirpes de *N. gonorrhoeae* resistentes às fluoroquinolonas em Portugal e verificação das concentrações mínimas inibitórias às cefalosporinas, de estirpes isoladas de *N. gonorrhoeae*, para avaliar a evolução das resistências aos antibióticos em Portugal em relação às tendências da União Europeia e para monitorizar a emergência e dispersão de estirpes resistentes.

A sequenciação e caracterização molecular de estirpes isoladas resistentes, em futuros estudos genotípicos, também poderiam fornecer informação importante que permitisse adotar estratégias de vigilância epidemiológica em Portugal.

A prevalência da gonorreia nas comunidades tende a ser dinâmica, flutuando ao longo do tempo, e influenciada por uma série de fatores interativos. Existem modelos matemáticos para a gonorreia sugerindo que a sua prevalência não é somente transmitida por pacientes assintomáticos mas também por um grupo de pessoas transmissoras que fazem parte da população em geral, que se infeta e transmite a infeção aos seus parceiros sexuais. Contudo, os membros do grupo transmissor, descritos nos modelos matemáticos mencionados anteriormente, partilham algumas características, incluindo zonas geográficas e baixo estatuto socioeconómico. Os mesmos modelos matemáticos, da teoria de transmissão por grupos de pessoas, sugerem que sem a transmissão hiper-endémica pelos membros do grupo de transmissores a prevalência da gonorreia declinará, talvez até zero, porque a transmissão não é 100 % eficiente e porque ocorrem curas espontâneas (Hook & Handsfield 2008). É portanto, importante considerar o rastreio destes grupos, uma ferramenta ao dispor para quebrar a cadeia de transmissão de gonorreia. De acordo com o CDC 2012b os grupos a serem considerados para o rastreio de rotina incluem: adolescentes; MSM; pessoas infetadas com HIV; pessoas com episódio (s) prévio (s) de gonorreia; trabalhadores do sexo; pessoas a entrar em instituições corretivas, especialmente em zonas de alta prevalência. Nessa perspetiva e como trabalho futuro, seria interessante considerar focar o rastreio em consultas de planeamento familiar e pré-natal; serviços de urgência; pousadas da juventude; universidades; festivais de música e até bares, onde grupos de maior risco

(como os jovens da mesma rede sexual) se reúnem, para a realização de estudos sobre epidemiologia de gonorreia em Portugal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIGNELL, C. (2009) 2009 European (IUSTI/WHO) Guideline on the Diagnosis and Treatment of Gonorrhoea in Adults. **International Journal of STD & AIDS**, 20 (7), pp. 453-557. Disponível na WWW:

http://www.iusti.org/regions/europe/pdf/2010/Euro_guideline_GC_2009.pdf [acedido a 12/02/2012]

BIGNELL, C. FITZGERALD, M. (2011) UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults, 2011. **International Journal of STD & AIDS**, 22 (n.d.), pp. 541-547.

BRADY, R.L. University of Bristol, UK. Em VIRJI, M. (2009) Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. **Nature reviews – Microbiology**, 7 (4), pp. 274-286. Disponível na WWW:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287450> [acedido a 28/01/2012]

CDC (2002) Screening Tests To Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections – 2002. *MMWR*, 51 (RR-15), pp. 1-40. Disponível na WWW:

http://www.cdc.gov/mmwr/indrr_2002.html [acedido a 20/12/2012]

CDC (2007) Update to CDC's sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006: fluoroquinolones no longer recommended for treatment of gonococcal infections. *MMWR*, 56 (14), pp. 332-336. Disponível na WWW:

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5614a3.htm> [acedido 01/12/2011]

CDC (2008) Recommendations for partner services programs for HIV infection. *MMWR*, 57 (RR-9), pp. 1-63. Disponível na WWW:

<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5709a1.htm> [acedido 01/12/2011]

CDC (2010a) Sexually transmitted diseases Surveillance 2009. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, pp. 17-31. Disponível na WWW:

<http://www.cdc.gov/std/stats09/surv2009-Complete.pdf> [acedido 16/01/2011]

CDC (2010b) Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR*, 59 (12), pp.49-55. Disponível na WWW:

<http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/STD-Treatment-2010-RR5912.pdf> [acedido 16/01/2011]

CDC (2011a) Neisseria gonorrhoeae with Reduced Susceptibility to Azithromycin – San Diego County, California, 2009. *MMWR*, 60 (18), pp. 579-581. Disponível na WWW:

http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6018a2.htm?s_cid=mm6018a2_w [acedido em 25/08/2012]

CDC (2011b) Cephalosporin Susceptibility Among Neisseria gonorrhoeae Isolates United States, 2000-2010. *MMWR*, 60 (26), pp. 873-877. Disponível na WWW:

http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6026a2.htm?s_cid=mm6026a2_w [acedido em 25/08/2012]

CDC (2012a) Update to CDC's Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010: Oral Cephalosporins No Longer a Recommended Treatment for Gonococcal Infections. *MMWR*, 61 (31), pp. 590-594. Disponível na WWW:

http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6131a3.htm?s_cid=mm6131a3_w
[acedido em 25/08/2012]

CDC (2012b) Report of an external consultants meeting convened by the division of STD prevention, national center for HIV, STD, and TB prevention. Centers for disease control and prevention. Disponível na WWW:

<http://www.cdc.gov/std/GCmtgreport.pdf> [acedido em 22/12/2012]

CHOUDHURY, B. RISLEY, C.L. AZRA, C.G. BISHOP, C.J. WARD, H. FENTON, K.A. ISON, C.A.; SPRATT, B.G. (2006) Identification of individuals with gonorrhoeae within sexual networks: a population-based study. **The Lancet**, 368, pp. 139-146. Disponível na WWW:

[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(06\)69003-X/fulltext#article_upsell](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(06)69003-X/fulltext#article_upsell) [acedido em 25/08/2012]

COHEN, M.S. HOFFMAN, I.F. ROYCE, R.A. KAZEMBE, P. DYER, J.R., DALY, C.C., ZIMBA, D. VERNAZZA, P.L. MAIDA, M. FISCUS, S.A. ERON JR, J.J. (1997) Reduction of concentration of HIV-1 in semen after treatment of urethritis: Implications for prevention of sexual transmission of HIV-1. **The Lancet**, 349, pp. 1868-1873. Disponível na WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673697021909> [acedido em 25/08/2012]

COSTA, J.B. AZEVEDO, J. SANTO, I. (2007) Características epidemiológicas de uma amostra de população utente da consulta de DST do centro de saúde da Lapa – Registo de 4 meses. Comunicação oral na reunião Norte da Sociedade Portuguesa de Dermatologia e venereologia, Espinho, Novembro de 2007.

COSTA, J.B. (2009) Infecções sexualmente transmissíveis em adolescentes: prevalência e associações com fatores sociodemográficos. Dissertação de Doutoramento no ramo de Ciências Biomédicas, UNL- IHMT.

COSTA, J.B. AZEVEDO, J. SANTO, I. (2010) Sexually transmitted infections and related sociodemographic factors in Lisbon's major Venereology Clinic: a descriptive study of the first 4 months of 2007. **Journal of European Academy Dermatology and Venereology**, 24 (7), 811-814.

COSTA, J.B. MATOS, C. PEREIRA, F. (2011) Sexually transmitted infections in pregnant adolescents: prevalence and association with maternal and foetal morbidity. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 26, pp. 972-975.

DEHIO, C. GRAY-OWEN, S.D. MEYER, T.F. (1998) The role of neisserial Opa proteins in interactions with host cells. **Trends in Microbiology**, 6 (12), pp. 489-495. Disponível na WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X98013651> [acedido a 14/12/2011]

DUYNHOVEN, Y. (1999) The epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Europe. **Microbes and Infection**, 1 (6), pp. 455-464. Disponível na WWW:

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=-120354373&_sort=r&_st=13&_view=c&_acct=C000228598&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=766acd9645f79389e843b2b0d86710a2&searchtype=a [acedido a 14/12/2012]

EASTICK, K. WINTER, A. JAMDAR, S. (2012) Identification of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with a recombinant *porA* gene in Scotland, United Kingdom, 2010 to 2011. **Euro Surveillance**, 17 (9), pp. (n.d.). Disponível em WWW:

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20101> [acedido a 23/05/2012]

EDWARDS, J.L. & APICELLA, M.A. (2004) The molecular mechanisms used by *Neisseria gonorrhoeae* to initiate infection differ between men and women. **Clinical Microbiology Reviews**, 17 (4), pp. 965-981. Disponível em WWW:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC523569/> [acedido a 13/01/2012]

ECDC (2009) Mapping of HIV/STI behavioral surveillance in Europe. ECDC Technical Report. Stockholm: ECDC. Disponível em WWW:

http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_Mapping_of_HIV_STI_Behavioural_Surveillance_in_Europe.pdf [acedido a 23/06/2012]

ECDC (2012) Sexually transmitted infections in Europe 1990-2010. Stockholm: ECDC, pp. 32-50. Disponível em WWW:

<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/201206-sexually-transmitted-infections-europe-2010.pdf> [acedido a 23/05/2012]

FEAVERS, I.M. & MAIDEN, M.C. (1998) A gonococcal porA pseudogene: implications for understanding the evolution and pathogenicity of *Neisseria gonorrhoeae*. **Molecular Microbiology**, 30, pp. 647-656.

FLEMING, D.T. & WASSERHEIT, J.N. (1999) From epidemiological synergy to public health policy and practice: the contribution of other sexually transmitted diseases to sexual transmission of HIV infection. **Sexual Transmitted Infections**, 75(1), pp. 3-17. Disponível em WWW:

<http://sti.bmj.com/content/75/1/3.full.pdf+html> [acedido a 12/11/2011]

GARCIA, S. CASCO, R. PERAZZI, B. MIER, C. VAY, C. FAMIGLIETTI, A. (2008) Resistencia de *Neisseria gonorrhoeae* a ciprofloxacina segun habitos sexuales. **Medicina**, 68, pp. 358-362. Disponível em WWW:

http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol6808/5/v68_n5_p358_362.pdf
[acedido a 25/08/2012]

GEWIRTZMAN, A. LAURA BOBRICK, L. CONNER, K. TYRING, S.K. (2011) Epidemiology of Sexually Transmitted Infections. In: GROSS, G. & TYRING, S.K. (eds.) Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases. Germany: Springer Berlin Heidelberg, pp. 13-34

GOIRE, N. NISSEN, M.D. LECORNEC, G.M. SLOOTS, T.P. WHILEY, D.M. (2008) A duplex *Neisseria gonorrhoeae* real-time polymerase chain reaction assay targeting the gonococcal porA pseudogene and multicopy opa genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 61 (1), pp.6-12). Disponível em WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889307005937> [acedido a 10/11/2011]

GOLPARIAN, D. JOHANSSON, E. UNEMO, M. (2012) Clinical *Neisseria gonorrhoeae* isolate with a *N. meningitidis porA* gene and no prolyliminopeptidase activity, Sweden, 2011 – danger of false-negative genetic and culture diagnostic results. **Euro Surveillance**, 17 (9), pp. (n.d.). Disponível em WWW:

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20102> [acedido a 23/05/2012]

GONÇALVES, L. (2011) Material de apoio às aulas de Epidemiologia Molecular do ano curricular do V Mestrado em Ciências Biomédicas.

GURTLER, V. MAYALL, B.C. WANG, J. (2012) HRM confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical specimens by G → A (position 857) mutation detection in the 16s rRNA gene before sequencing and after porA confirmation. **Journal of Microbiological Methods**, 89 (n.d.), pp. 148-152. Disponível em WWW:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701212000917> [acedido a 23/10/2012]

HAMILTON, H.L. & DILLARD, J.P. (2006) Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. **Molecular Microbiology**, 59 (2), pp. 376-385. Disponível em WWW:

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2958.2005.04964.x/pdf> [acedido a 23/10/2011]

HEALTH PROTECTION AGENCY. EUROPEAN COMMISSION (2008) Sexually Transmitted Infections surveillance in Europe. ESSTI surveillance annual report no.3

http://ec.europa.eu/health/ph_projects/2004/action2/docs/2004_2_08_a1_en.pdf

[acedido a 23/05/2012]

HERIDA, M. SEDNAOUI, P. GOULET, V. (2004) *Gonorrhoea* surveillance system in France: 1986-2000. **Sexually Transmitted Diseases**; 31 (4); pp. 209-214. Disponível em WWW:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15028933> [acedido a 23/07/2012]

HJELMEVOLL, S.O. OLSEN, M.E. SOLLID, J.U. HAAHEIM, H. UNEMO, M. SKOGEN, V. (2006) A fast Real-Time Polymerase Chain Reaction Method for Sensitive and Specific Detection of the *Neisseria gonorrhoeae porA* Pseudogene. **Journal of Molecular Diagnostic**, 8 (5), pp. 574-581. Disponível na WWW:

<http://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1876173/?tool=pmcentrez> [acedido a 02/12/2011]

HO, B.S.W. FENG, W.G. WONG, B.K.C. EGGLESTONE, S.I. (1992) Polymerase chain reaction for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in clinical samples. **Journal of Clinical Pathology**, 45 (5), pp. 439-442. Disponível na WWW:

http://www.researchgate.net/publication/21557256_Polymerase_chain_reaction_for_the_detection_of_Neisseria_gonorrhoeae_in_clinical_samples [acedido a 23/10/2011]

HOOK, E.W. & HANDSFIELD, H.H. (2008) *Gonococcal Infections in Adult*. Em: HOLMES, K.K SPARLING, P.F. STAMM, E.E. PIOT, P. WASSERHEIT, J.N. COREY, L. COHEN, M.S. WATTS, D.H. (eds.) **Sexually Transmitted Diseases**. Fourth edition. China: Mc Graw Hill, pp. 627-645.

INSTITUTO CAMÕES (2006) Doenças Sexualmente Transmissíveis. Disponível na WWW:

<http://www.instituto-camoes.pt/glossario/Textos/Medicina/HTM/herpesgenital.html>

[acedido a 23/10/2011]

JOHNSON, A.M. MERCER, C.H. ERENS, B COPAS, A.J. MCMANUS, S. WELLINGS, K. FENTON, K.A. KOROVESSIS, C. MACDOWALL, W. NANCHAHAL, K. PURDON, S.FIELD, J. (2001) Sexual behavior in Britain: partnerships, practices, and HIV risk behaviors. **Lancet**, 358 (9296), pp. 1835-1842. Disponível na WWW:

[http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(01\)06883-0/abstract](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(01)06883-0/abstract)

[acedido a 23/10/2012]

KONEMAN, E.W. ALLEN, S.D. JANDA, W.M. SCHRECKENBERGER, P.C. WINN, W.C. (1997) Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth edition. London: Lippicott Williams & Wilkins, pp. 491-537.

LUM, G. FREEMAN, K. NGUYEN, N.L. LIMNIOS, E.A. TABRIZI, S.N. CARTER, I. CHAMBERS, I.W. WHILEY, D.M. SLOOTS, T.P. GARLAND, S.M. TAPSALL, J.W. (2005) A cluster of culture positive gonococcal infections but with false negative *ccpB* gene based PCR. **Sexually Transmitted Infections**, 81 (5), pp. 400-402. Disponível na WWW:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16199739> [acedido a 23/10/2011]

MACDONALD, N. E. STANBROOK, M.B. FLEGEL, K. HÉBERT, P.C. ROSENFELD, D. (2011) Gonorrhea: what goes around comes around. **Canadian Medical Association Journal**, 183 (14), pp. 1567. Disponível na WWW:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185068/> [acedido a 12/02/2012]

MAZE, M.J. YOUNG, S. CREIGHTON, J. ANDERSON, T. WERNO, A. (2011) Nucleic Acid Amplification of the *opa* Gene for Detection of *Neisseria gonorrhoeae*: Experience from a Diagnostic Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, 49 (3), pp. 1128-1129. Disponível na WWW:

<http://europepmc.org/articles/PMC3067690//reload=0;jsessionid=WbD9qt7xevx0Tv9DnApG.12> [acedido a 10/01/2012]

MINISTÉRIO DA SAÚDE DE PORTUGAL. DGS (2004) Plano Nacional de Saúde 2004/2010. Disponível na WWW:

http://www.dgsaude.min-saude.pt/pns/vol2_221.html [acedido a 20/10/2011]

MINISTÉRIO DA SAÚDE DE PORTUGAL. DGS (2011) Programa Nacional de prevenção e controlo de infeção HIV e sida 2011-2015. Disponível na WWW:

http://sm.vectweb.pt/media/64/File/Actualidades/NoticiasGerais/PROGRAMA_NACIONAL_2011-2015%20hb.pdf [acedido a 05/10/2012]

NAHMIAS, S.B. & NAHMIAS, D. (2011) Society, sex, and STIs: human behavior and the evolution of sexually transmitted diseases and their agents. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1230 (1), 59-73. Disponível na WWW:

<http://web.ebscohost.com/ehost/detail?sid=c4001549-57a2-4fe3-82c7-1a341c31e466%40sessionmgr110&vid=1&hid=108&bdata=JnNpdGU9ZWhvc3QtbG12ZSZzY29wZT1zaXRI#db=a9h&AN=641152321> [acedido a 02/09/2012]

NHS (2012) Guidance on the use of molecular testing for *Neisseria gonorrhoeae* in Diagnostic Laboratories 2011. Scotland: Scottish Bacterial Sexually Transmitted Infections Reference Laboratory. Disponível na WWW:

<http://www.hps.scot.nhs.uk/Search/default.aspx?search=Guidance%20on%20the%20use%20of%20molecular%20testing%20for%20Neisseria%20gonorrhoeae%20in%20Diagnostic%20Laboratories%202011> [acedido a 22/08/2012]

OTERO, L. VILLAR, H. VÁSQUEZ, J.A. VÁSQUEZ, F. (2002) *Neisseria gonorrhoeae* resistente a quinolonas: un nuevo problema de salud pública en España. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 20 (3), pp. 123-126. Disponível na WWW:

<http://www.elsevier.es> [acedido a 28/08/2012]

PATEL, A.L. CHAUDHRY, U. SACDEV, D. SACHDEVA, P.N. BALA, M. SALUJA, D. (2011) An insight into drug resistance profile & mechanism of drug resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. **Indian Journal of Medical Research**, 134 (4), pp. 419-431. Disponível na WWW: <http://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237238/> [acedido a 23/08/2012]

PATRONE, J. B. STEIN, D. C. (2007) Effect of gonococcal lipooligosaccharide variation on human monocytic cytokine profile. **BMC Microbiology**, 7 (7), pp. n.d. Disponível na WWW: <http://WWW.biomedcentral.com/1471-2180/7/7> [acedido a 28/01/2012]

PENNA, O.G. HAJJAR, L.A. BRAZ, T.M. (2000) Gonorreia. Artigo de revisão. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 33 (5), pp. 451-464. Disponível na WWW:

<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v33n5/3125.pdf> [acedido a 16/08/2012]

RICE, R.J. ROBERTS, P.L. HANDSFIELD, H.H. HOLMES, K.K. (1991) Sociodemographic Distribution of Gonorrhea Incidence: Implications for prevention and Behavioral Research. **American Journal of Public Health**, 81 (10), pp. 1252-1258. Disponível na WWW:

<http://web.ebscohost.com/ehost/detail?sid=285fb0c9-7584-4fd2-9898-5b45b85684a8%40sessionmgr104&vid=1&hid=108&bdata=JnNpdGU9ZWhvc3QtbGI2ZSZzY29wZT1zaXRI#db=heh&AN=9112090804> [acedido a 10/09/2012]

SANTO, I. AZEVEDO, J. (2011) Consulta DST, Centro de Saúde da Lapa – Infecções sexualmente transmissíveis. Poster. Disponível na WWW:

http://www.vihportugal.org/pdfs/CAD_Lapa_JACINTA_AZEVEDO.pdf [acedido a 26/09/2012]

SNYDER, L.A.S. DAVIES, J.K. RYAN, C.S. SAUNDERS, N.J. (2005) Comparative overview of the genomic and genetic differences between the pathogenic *Neisseria* strains and species. **Plasmid**; 54 (3), pp. 191-218. Disponível na WWW:

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=- [acedido a 02/02/2012]

SPARLING, P.F. (2008) *Biology of Neisseria gonorrhoeae*. Em: HOLMES, K.K. SPARLING, P.F. STAMM, E.E. PIOT, P. WASSERHEIT, J.N. COREY, L. COHEN, M.S. WATTS, D.H. (eds.) **Sexually Transmitted Diseases**. Fourth edition. China: Mc Graw Hill, pp. 607-626.

SWARTZENDRUBER, A. BROWN, J.L. SALES, J.M. MURRAY, C.C. DICLEMENTE, R.J. (2012) Sexually Transmitted Infections, Sexual Risk Behavior, and Intimate Partner Violence Among African American Adolescent Females With a Male Sex Partner Recently Released from Incarceration. **Journal of Adolescent Health**, 51, pp. 156-163. Disponível na WWW:

[http://www.jahonline.org/article/S1054-139X\(01\)00346-9/pdf](http://www.jahonline.org/article/S1054-139X(01)00346-9/pdf) [acedido a 22/09/2012]

TÁVORA-TAVIRA, L. TEODÓSIO, R. SEIXAS, J. PRIETO, E. CASTRO, R. EXPOSTO, F. ATOUGUIA, J. (2007) Infecções sexualmente transmissíveis numa população migrante Africana em Portugal: estudo de base resultante do projecto “Epi-Migra”. **Migrações**, 1, pp. 129-139. Disponível na WWW:

http://www.oi.acidi.gov.pt/docs/Revista_1/migracoes1_art6.pdf [acedido a 26/09/2012]

VAZQUEZ, J.A. DE LA FUENTE, L. BERRON, S. O'ROURKE, M. SMITH, N.H. ZHOU, J. SPRATT, B.G. (1993) Ecological separation and genetic isolation of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Curr Biol*, 3, pp.567-572.

VIRJI, M. (2009) Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control. **Nature reviews – Microbiology**, 7 (4), pp. 274-286. Disponível na WWW:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287450> [acedido a 28/01/2012]

WALSH, A. ROURKE, F.O. CROWLEY, B. (2011) Molecular detection and confirmation of *Neisseria gonorrhoeae* in urogenital and extragenital specimens using the Abbott CT/NG RealTime assay and an in-house assay targeting the *porA* pseudogene. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 30 (4), pp. 561-567. Disponível na WWW:

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10096-010-1120-y> [acedido a 02/12/2011]

WHILEY, D.M. BUDA, P.J. BAYLISS, J. COVER, L. BATES, J. SLOOTS, T.P. (2004) A new confirmatory *Neisseria gonorrhoeae* real-time PCR assay targeting the *porA* pseudogene. **European Journal of Clinical Microbiology**, 23 (9), pp. 705-710. Disponível na WWW:

<http://link.springer.com/article/10.10096-004-1170-0/fulltext.html> [acedido a 19/11/2011]

WHILEY, D.M. BUDA, P.J. FREEMAN, K. PATTLE, N.I. BATES, J. SLOOTS, T.P. (2005) A real-time PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* in genital and extragenital specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, 52 (1), pp.1-5.

WHILEY, D.M. TAPSALL, J.W. SLOOTS, T.P. (2006) Nucleic Acid Amplification Testing for *Neisseria gonorrhoeae*. **The Journal of Molecular Diagnostics**, 8 (1), pp. 3-15. Disponível na WWW:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1871692/> [acedido a 28/10/2011]

WHILEY, D.M. GARLAND, S.M. HARNETT G. LUM G. SMITH D.W. TABRIZI S.N. SLOOTS T.P. TAPSALL J.W. (2008) Exploring 'best practice' for nucleic acid detection of *Neisseria gonorrhoeae*. **Sexual Health**, 5 (1), pp. 17-23. Disponível na WWW:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18361850> [acedido a 28/10/2011]

WHILEY, D.M. LIMNIOS, A. MOON, N.J. GEHRIG, N. GOIRE, N. HOGAN, t.; LAM, A. JACOB, K. LAMBERT, S.B. NISSEN, M.D. SLOOTS, T.P. (2011) False-negative results using *Neisseria gonorrhoeae porA* pseudogene PCR – a clinical gonococcal isolate with an *N. meningitides porA* sequence, Australia, March 2011. **Euro Surveillance**, 16 (21), pp. (n.d.) Disponível na WWW:

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19874> [acedido a 28/12/2011]

WHITTINGTON, W.L.H. COLLIS, T. DITHMER-SCHRECK, D. HANDSFIELD, H.H. SHALIT, P. WOOD, R.W. HOLMES, K.K. CELUM, C.L. (2002) Sexually Transmitted Diseases and Human Immunodeficiency Virus-Discordant Partnerships among Men Who Have Sex with Men. **Clinical Infectious Diseases**, 35 (8), pp. 1010-1017.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12355390> [acedido a 28/09/2012]

WHO (2012a) Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Switzerland: WHO. Disponível na WWW:

<http://www.who.int> [acedido a 28/08/2012]

WHO (2012b) Strategies and laboratory methods for strengthening surveillance of sexual transmitted infections. Switzerland: WHO. Disponível na WWW:

<http://www.who.int> [acedido a 16/12/2012]

ANEXOS

Anexo 1: Análise descritiva em SPSS

```
FREQUENCIES VARIABLES=RTPCR ccpb RFLP DPrevNgon DPrevHIV DPrevsifilis DPREVCT DPREVHCV Dprev
/ORDER=ANALYSIS.
```

Frequencies

		Notes
Output Created		01-DEC-2012 10:51:42
Comments		
	Data	C: \Users\Raquel\Documents\Tese\AnaliseEstatistica.sav
Input	Active Dataset	DataSet1
	File Label	
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	145
Missing Value Handling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics are based on all cases with valid data.
Weight Handling		
Syntax		FREQUENCIES VARIABLES=RTPCR ccpb RFLP DPrevNgon DPrevHIV DPrevsifilis DPREVCT DPREVHCV DprevHPV sexo orisex escolari ISTPREV NACIONALIDADE motivcons /ORDER=ANALYSIS.
Resources	Processor Time	00:00:00,08
	Elapsed Time	00:00:00,25

[DataSet1] C:\Users\Raquel\Documents\Tese\AnaliseEstatistica.sav

Statistics

		RT PCR	ccpb	RFLP	DPrevNgon	DPrevHIV	DPrevsifilis	DPREVCT
N	Valid	145	145	137	145	145	145	145
	Missing	0	0	8	0	0	0	0

Statistics

		DPREVHCV	DprevHPV	sexo	orisex	escolari	IST PREV
N	Valid	145	145	145	145	143	143
	Missing	0	0	0	0	2	2

Statistics

		NACIONALIDAD E	motiv cons
N	Valid	145	145
	Missing	0	0

Frequency Table

RT PCR

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	8	5,5	5,5	5,5
	2	137	94,5	94,5	100,0
	Total	145	100,0	100,0	

ccpb

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	6	4,1	4,1	4,1
	2	139	95,9	95,9	100,0
	Total	145	100,0	100,0	

RFLP

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	2	137	94,5	100,0	100,0
Missing	System	8	5,5		
Total		145	100,0		

DPrevNgon

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	7	4,8	4,8	4,8
	2	138	95,2	95,2	100,0
	Total	145	100,0	100,0	

DPrevHIV

		Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
Valid	1	7	4,8	4,8	4,8
	2	138	95,2	95,2	100,0
	Total	145	100,0	100,0	

DPrevsifilis

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	10	6,9	6,9	6,9
Valid 2	135	93,1	93,1	100,0
Total	145	100,0	100,0	

DPREVCT

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	3	2,1	2,1	2,1
Valid 2	142	97,9	97,9	100,0
Total	145	100,0	100,0	

DPREVHCV

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	4	2,8	2,8	2,8
Valid 2	141	97,2	97,2	100,0
Total	145	100,0	100,0	

DprevHPV

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	9	6,2	6,2	6,2
Valid 2	136	93,8	93,8	100,0
Total	145	100,0	100,0	

sexo

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	116	80,0	80,0	80,0
Valid 2	29	20,0	20,0	100,0
Total	145	100,0	100,0	

orisex

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	125	86,2	86,2	86,2
Valid 2	20	13,8	13,8	100,0
Total	145	100,0	100,0	

escolari

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
0	1	,7	,7	,7
4	17	11,7	11,9	12,6
5	1	,7	,7	13,3
6	8	5,5	5,6	18,9
7	6	4,1	4,2	23,1
8	2	1,4	1,4	24,5
Valid 9	25	17,2	17,5	42,0
10	6	4,1	4,2	46,2
11	13	9,0	9,1	55,2
12	28	19,3	19,6	74,8
13	1	,7	,7	75,5
16	35	24,1	24,5	100,0
Total	143	98,6	100,0	
Missing System	2	1,4		
Total	145	100,0		

IST PREV

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	35	24,1	24,5	24,5
Valid 2	108	74,5	75,5	100,0
Total	143	98,6	100,0	
Missing System	2	1,4		
Total	145	100,0		

NACIONALIDADE

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	93	64,1	64,1	64,1
2	15	10,3	10,3	74,5
3	9	6,2	6,2	80,7
4	5	3,4	3,4	84,1
5	2	1,4	1,4	85,5
6	4	2,8	2,8	88,3
7	4	2,8	2,8	91,0
Valid 8	2	1,4	1,4	92,4
10	3	2,1	2,1	94,5
11	3	2,1	2,1	96,6
13	1	,7	,7	97,2
21	1	,7	,7	97,9
25	1	,7	,7	98,6
32	1	,7	,7	99,3
37	1	,7	,7	100,0
Total	145	100,0	100,0	

motiv cons

	Frequency	Percent	Valid Percent	Cumulative Percent
1	39	26,9	26,9	26,9
2	29	20,0	20,0	46,9
3	2	1,4	1,4	48,3
4	3	2,1	2,1	50,3
5	2	1,4	1,4	51,7
6	3	2,1	2,1	53,8
7	14	9,7	9,7	63,4
8	9	6,2	6,2	69,7
Valid 9	10	6,9	6,9	76,6
10	15	10,3	10,3	86,9
11	13	9,0	9,0	95,9
12	1	,7	,7	96,6
13	1	,7	,7	97,2
15	2	1,4	1,4	98,6
16	1	,7	,7	99,3
17	1	,7	,7	100,0
Total	145	100,0	100,0	

```

DATASET ACTIVATE DataSet1.
SAVE OUTFILE='C:\Users\Raquel\Documents\Tese\AnaliseEstadistica.sav'
/COMPRESSED.
DATASET ACTIVATE DataSet1.
SAVE OUTFILE='C:\Users\Raquel\Documents\Tese\AnaliseEstadistica.sav'
/COMPRESSED.
DESCRIPTIVES VARIABLES=idade escolar PARCE6MESES
/STATISTICS=MEAN STDDEV MIN MAX.

```

Descriptives

Notes

```

Output Created          01-DEC-2012 10:53:57
Comments

Data                   C:
                      \Users\Raquel\Documents\Tese\AnaliseEstati
                      stica.sav
Active Dataset         DataSet1
Input                  File Label
                      Filter          <none>
                      Weight         <none>
                      Split File     <none>
                      N of Rows in Working Data File      145

Missing Value Handling Definition of Missing      User defined missing
                                                values are treated as
                                                missing.
                      Cases Used        All non-missing data
                                                are used.

Weight Handling

Syntax                 DESCRIPTIVES
                      VARIABLES=idade
                      escolarari
                      PARCE6MESES
                      /STATISTICS=MEAN
                      STDDEV MIN MAX.

Resources              Processor Time          00:00:00,02
                      Elapsed Time          00:00:00,02
    
```

[DataSet1] C:\Users\Raquel\Documents\Tese\AnaliseEstadistica.sav

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
idade	145	14	81	32,01	12,746
escolari	143	0	16	10,60	4,020
PARCE6MESES	145	0	10	1,76	1,340
Valid N (listwise)	143				

```

SAVE OUTFILE='C:\Users\Raquel\Desktop\AnaliseEstadistica.sav'
/COMPRESSED.
    
```

Anexo 2: Análise de inferência nominal em SPSS

```

CROSSTABS
  /TABLES=RTPCR BY DPrevNgon DPrevHIV DPrevsifilis DPREVCT DPREVHCV DprevHPV sexo orisex ISI
  /FORMAT=AVALUE TABLES
  /STATISTICS=CHISQ PHI
  /CELLS=COUNT EXPECTED
  /COUNT ROUND CELL.
    
```

Crosstabs

		Notes
Output Created		01-DEC-2012 11:24:27
Comments		
	Data	C: \Users\Raquel\Desktop \AnaliseEstatistica.sav
	Active Dataset	DataSet1
Input	File Label	
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	145
	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
Missing Value Handling		Statistics for each table are based on all the cases with valid data in the specified range(s) for all variables in each table.
	Cases Used	
Weight Handling		
Syntax		CROSSTABS /TABLES=RTPCR BY DPrevNgon DPrevHIV DPrevsifilis DPREVCT DPREVHCV DprevHPV sexo orisex ISTPREV NACIONALIDADE motivcons QueixasCorrime /FORMAT=AVALUE TABLES /STATISTICS=CHISQ PHI /CELLS=COUNT EXPECTED /COUNT ROUND CELL.
	Processor Time	00:00:00,34
	Elapsed Time	00:00:00,52

Notes

Dimensions Requested **2**
Cells Available **174762**

[DataSet1] C:\Users\Raquel\Desktop\AnaliseEstatistica.sav

Case Processing Summary

	Cases					
	Valid		Missing		Total	
	N	Percent	N	Percent	N	Percent
RT PCR * DPrevNgon	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * DPrevHIV	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * DPrevSifilis	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * DPREVCT	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * DPREVHCV	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * DprevHPV	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * sexo	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * orisex	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * IST PREV	143	98,6%	2	1,4%	145	100,0%
RT PCR * NACIONALIDADE	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * motiv cons	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%
RT PCR * QueixasCorrime	145	100,0%	0	0,0%	145	100,0%

RT PCR * DPrevNgon

Crosstab

		DPrevNgon			
		1	2	Total	
RT PCR	1	Count	0	8	8
		Expected Count	,4	7,6	8,0
2	Count	7	130	137	
	Expected Count	6,6	130,4	137,0	
Total	Count	7	138	145	
	Expected Count	7,0	138,0	145,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,429 ^a	1	,512		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,815	1	,367		
Fisher's Exact Test				1,000	,66
Linear-by-Linear Association	,427	1	,514		
N of Valid Cases	145				

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,39.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	,054			,512
	Cramer's V	,054			,512
N of Valid Cases		145			

- a. Not assuming the null hypothesis.
- b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * DPrevHIV

Crosstab

		DPrevHIV		Total	
		1	2		
RT PCR	1	Count	0	8	8
		Expected Count	,4	7,6	8,0
2	Count	7	130	137	
	Expected Count	6,6	130,4	137,0	
Total	Count	7	138	145	
	Expected Count	7,0	138,0	145,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,429^a	1	,512		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,815	1	,367		
Fisher's Exact Test				1,000	,666
Linear-by-Linear Association	,427	1	,514		
N of Valid Cases	145				

- a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,39.
- b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	,054			,512
	Cramer's V	,054			,512
N of Valid Cases		145			

- a. Not assuming the null hypothesis.
- b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * DPrevsifilis

Crosstab

		DPrevsifilis		Total	
		1	2		
RT PCR	1	Count	0	8	8
		Expected Count	,6	7,4	8,0
	2	Count	10	127	137
		Expected Count	9,4	127,6	137,0
Total	Count	10	135	145	
	Expected Count	10,0	135,0	145,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,627 ^a	1	,428		
Continuity Correction ^b	,006	1	,941		
Likelihood Ratio	1,177	1	,278		
Fisher's Exact Test				1,000	,556
Linear-by-Linear Association	,623	1	,430		
N of Valid Cases	145				

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,55.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	-,066			,428
	Cramer's V	,066			,428
N of Valid Cases		145			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * DPREVCT

Crosstab

		DPREVCT		Total	
		1	2		
RT PCR	1	Count	1	7	8
		Expected Count	,2	7,8	8,0
	2	Count	2	135	137
		Expected Count	2,8	134,2	137,0
Total	Count	3	142	145	
	Expected Count	3,0	142,0	145,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,547^a	1	,033		
Continuity Correction ^b	,731	1	,393		
Likelihood Ratio	2,300	1	,129		
Fisher's Exact Test				,158	,158
Linear-by-Linear Association	4,516	1	,034		
N of Valid Cases	145				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,17.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	,177		,033
	Cramer's V	,177		,033
N of Valid Cases	145			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * DPREVHCV

Crosstab

		DPREVHCV		Total
		1	2	
RT PCR	1	Count	0	8
		Expected Count	,2	7,8
	2	Count	4	133
		Expected Count	3,8	133,2
Total	Count	4	141	
	Expected Count	4,0	141,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,240^a	1	,624		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,461	1	,497		
Fisher's Exact Test				1,000	,795
Linear-by-Linear Association	,239	1	,625		
N of Valid Cases	145				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,22.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	-,041			,624
	Cramer's V	,041			,624
N of Valid Cases		145			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * DprevHPV**Crosstab**

		DprevHPV			
		1	2	Total	
RT PCR	1	Count	0	8	8
		Expected Count	,5	7,5	8,0
	2	Count	9	128	137
		Expected Count	8,5	128,5	137,0
Total		Count	9	136	145
		Expected Count	9,0	136,0	145,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	,560 ^a	1	,454		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	1,056	1	,304		
Fisher's Exact Test				1,000	,591
Linear-by-Linear Association	,556	1	,456		
N of Valid Cases		145			

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,50.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	-,062			,454
	Cramer's V	,062			,454
N of Valid Cases		145			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * sexo

Crosstab

		sexo		Total	
		1	2		
RT PCR	1	Count	8	0	8
		Expected Count	6,4	1,6	8,0
	2	Count	108	29	137
		Expected Count	109,6	27,4	137,0
Total		Count	116	29	145
		Expected Count	116,0	29,0	145,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,117 ^a	1	,146		
Continuity Correction ^b	1,001	1	,317		
Likelihood Ratio	3,685	1	,055		
Fisher's Exact Test				,358	,160
Linear-by-Linear Association	2,102	1	,147		
N of Valid Cases	145				

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,60.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	,121		,146
	Cramer's V	,121		,146
N of Valid Cases	145			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * orisex

Crosstab

		orisex		Total	
		1	2		
RT PCR	1	Count	6	2	8
		Expected Count	6,9	1,1	8,0
	2	Count	119	18	137
		Expected Count	118,1	18,9	137,0
Total		Count	125	20	145
		Expected Count	125,0	20,0	145,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,894^a	1	,344		
Continuity Correction ^b	,175	1	,676		
Likelihood Ratio	,758	1	,384		
Fisher's Exact Test				,304	,304
Linear-by-Linear Association	,888	1	,346		
N of Valid Cases	145				

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,10.
 b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	-,079		,344
	Cramer's V	,079		,344
N of Valid Cases	145			

a. Not assuming the null hypothesis.
 b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * IST PREV

Crosstab

		IST PREV		Total	
		1	2		
RT PCR	1	Count	4	2	6
		Expected Count	1,5	4,5	6,0
2	Count	31	106	137	
	Expected Count	33,5	103,5	137,0	
Total	Count	35	108	143	
	Expected Count	35,0	108,0	143,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	6,031^a	1	,014		
Continuity Correction ^b	3,884	1	,049		
Likelihood Ratio	5,002	1	,025		
Fisher's Exact Test				,032	,032
Linear-by-Linear Association	5,989	1	,014		
N of Valid Cases	143				

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,47.
 b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	,205			,014
	Cramer's V	,205			,014
N of Valid Cases		143			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * NACIONALIDADE

Crosstab

		NACIONALIDADE					
		1	2	3	4	5	6
RT PCR	1	Count	5	2	1	0	0
		Expected Count	5,1	,8	,5	,3	,1
2	Count	88	13	8	5	2	4
	Expected Count	87,9	14,2	8,5	4,7	1,9	3,8
Total	Count	93	15	9	5	2	4
	Expected Count	93,0	15,0	9,0	5,0	2,0	4,0

Crosstab

		NACIONALIDADE					
		7	8	10	11	13	21
RT PCR	1	Count	0	0	0	0	0
		Expected Count	,2	,1	,2	,2	,1
2	Count	4	2	3	3	1	1
	Expected Count	3,8	1,9	2,8	2,8	,9	,9
Total	Count	4	2	3	3	1	1
	Expected Count	4,0	2,0	3,0	3,0	1,0	1,0

Crosstab

		NACIONALIDADE			Total
		25	32	37	
RT PCR	1	Count	0	0	0
		Expected Count	,1	,1	,1
2	Count	1	1	1	137
	Expected Count	,9	,9	,9	137,0
Total	Count	1	1	1	145
	Expected Count	1,0	1,0	1,0	145,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	3,937^a	14	,996
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	4,890	14	,987
Linear-by-Linear Association	,750	1	,386
N of Valid Cases	145		

a. 26 cells (86,7%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,06.

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	,165			,996
	Cramer's V	,165			,996
N of Valid Cases		145			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * motiv cons

Crosstab

		motiv cons						
		1	2	3	4	5	6	
RT PCR	1	Count	0	6	0	0	0	0
		Expected Count	2,2	1,6	,1	,2	,1	,2
	2	Count	39	23	2	3	2	3
		Expected Count	36,8	27,4	1,9	2,8	1,9	2,8
Total		Count	39	29	2	3	2	3
		Expected Count	39,0	29,0	2,0	3,0	2,0	3,0

Crosstab

		motiv cons						
		7	8	9	10	11	12	
RT PCR	1	Count	0	0	0	0	0	0
		Expected Count	,8	,5	,6	,8	,7	,1
	2	Count	14	9	10	15	13	1
		Expected Count	13,2	8,5	9,4	14,2	12,3	,9
Total		Count	14	9	10	15	13	1
		Expected Count	14,0	9,0	10,0	15,0	13,0	1,0

Crosstab

		motiv cons				Total	
		13	15	16	17		
RT PCR	1	Count	1	1	0	0	8
		Expected Count	,1	,1	,1	,1	8,0
	2	Count	0	1	1	1	137
		Expected Count	,9	1,9	,9	,9	137,0
Total		Count	1	2	1	1	145
		Expected Count	1,0	2,0	1,0	1,0	145,0

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	44,122^a	15	,000
Continuity Correction			
Likelihood Ratio	29,565	15	,014
Linear-by-Linear Association	,078	1	,780
N of Valid Cases	145		

a. 25 cells (78,1%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,06.

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	,552			,000
	Cramer's V	,552			,000
N of Valid Cases		145			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

RT PCR * QueixasCorrime

Crosstab

		QueixasCorrime		Total	
		sim	não		
RT PCR	1	Count	6	2	8
		Expected Count	1,6	6,4	8,0
2	Count	23	114	137	
	Expected Count	27,4	109,6	137,0	
Total	Count	29	116	145	
	Expected Count	29,0	116,0	145,0	

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2- sided)	Exact Sig. (2- sided)	Exact Sig. (1- sided)
Pearson Chi-Square	16,008 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	12,577	1	,000		
Likelihood Ratio	12,131	1	,000		
Fisher's Exact Test				,001	,001
Linear-by-Linear Association	15,898	1	,000		
N of Valid Cases	145				

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,60.

b. Computed only for a 2x2 table

Symmetric Measures

		Value	Asymp. Std. Error ^a	Approx. T ^b	Approx. Sig.
Nominal by Nominal	Phi	,332			,000
	Cramer's V	,332			,000
N of Valid Cases		145			

a. Not assuming the null hypothesis.

b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.

Anexo 3: Análise de inferência nominal em SPSS - Teste de MW

```
*Nonparametric Tests: Independent Samples.
NPTESTS
  /INDEPENDENT TEST (idade escolar PARCE6MESES) GROUP (RTPCR) MANN_WHITNEY
  /MISSING SCOPE=ANALYSIS USERMISSING=EXCLUDE
  /CRITERIA ALPHA=0.05 CILEVEL=95.
```

Nonparametric Tests

		Notes
Output Created		01-DEC-2012 11:44:35
Comments		
	Data	C: \Users\Raquel\Desktop \AnaliseEstatistica.sav
	Active Dataset	DataSet1
Input	File Label	
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	145
Missing Value Handling	Definition of Missing	
	Cases Used	
Weight Handling		
		NPTESTS /INDEPENDENT TEST (idade escolar PARCE6MESES) GROUP (RTPCR) MANN_WHITNEY /MISSING SCOPE=ANALYSIS USERMISSING=EXCLU DE /CRITERIA ALPHA=0. 05 CILEVEL=95.
Syntax		
Resources	Processor Time	00:00:01,12
	Elapsed Time	00:00:01,62

[DataSet1] C:\Users\Raquel\Desktop\AnaliseEstatistica.sav

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of idade is the same across categories of RT PCR.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,808	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of escolarari is the same across categories of RT PCR.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,093	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of PARCE6MESES is the same across categories of RT PCR.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,010	Reject the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,05.

Anexo 4: Tabela de resultados e dados dos utentes

Amostra	RealTime	ccpb	RFLP	DPNG	DPHIV	DPsifiliss	DPCT	DPVHC	DprevVPH	Sexo	Idade	Osexual	Escolaridade	ISTP	Par6MesesS	Nacionalidade	M consulta
9169	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	70	1	4	2	2	1	7
8987	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	35	1	9	2	3	1	1
8840	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	37	1	4	2	1	1	8
9034	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	19	1	9	1	4	1	2
9055	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20	1	11	2	1	1	7
9043	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	51	1	7	1	1	1	7
8952	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	25	1	9	2	1	1	1
9012	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	24	2	16	2	1	1	2
7015	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	20	1	9	2	1	1	2
9238	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	22	1	16	2	1	3	1
9199	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	34	1	8	1	3	1	2
9148	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	38	2	4	1	2	1	1
8830	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	56	1	12	2	1	7	11
9048	2	2	2	2	1	1	2	2	2	2	67	1	4	2	1	1	7
9158	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	28	1		1	2	1	2
8942	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	17	2	6	1	1	1	12
9088	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	46	1	6	2	1	1	11
8993	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	51	1	7	2	1	1	11
8996	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	53	1	6	2	5	1	7
9136	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	45	1	6	2	1	1	9
9133	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	47	1	4	2	2	1	4
7014	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	56	1	4	1	1	3	6

6939	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	26	1	12	1	2	1	9
9235	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	27	1	12	1	2	1	9
9172	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	36	1	6	2	1	1	1
9094	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	18	1	9	1	1	1	9
9236	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	27	1	9	2	1	1	1
9109	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	29	2		1	3	1	2
9086	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	41	1	6	2	1	1	11
9142	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	28	1	12	2	1	1	7
9087	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	48	1	4	2	1	1	8
9205	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	44	1	11	2	1	1	1
9110	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	22	1	12	2	6	1	1
9075	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	36	1	10	2	1	1	10
9009	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	22	2	12	2	1	1	1
9207	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	39	1	12	2	2	1	9
9232	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	31	1	12	2	1	1	1
8254	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	41	2	16	1	2	1	6
8835	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	45	1	4	1	10	1	8
7009	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	41	1	16	2	1	1	9
9060	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	26	1	12	2	4	3	1
9234	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	23	1	12	2	1	1	10
9237	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	31	1	16	2	3	1	1
9146	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	35	1	12	2	1	1	1
8988	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	34	1	10	2	2	3	2
8992	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	26	1	9	2	1	1	17
8260	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	23	1	11	2	6	1	3
9192	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	30	1	9	2	3	1	3

9239	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	17	1	11	2	3	11	1
9144	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	37	1	16	2	1	1	1
9143	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	70	1	4	2	2	1	8
9166	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	22	1	9		2	2	2
8939	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	24	1	16	2	1	8	2
8990	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	33	1	16	1	2	2	7
9030	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	23	1	9	2	3	7	10
9111	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	29	1	16	2	1	10	4
8925	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	29	2	12	1	5	4	1
9078	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	36	1	12	2	1	1	1
9052	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	21	1	9	2	2	2	2
9242	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	65	1	4	1	2	11	11
9145	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	30	1	12	2	3	1	1
8836	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	22	1	11	2	7	1	1
9085	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	40	1	0	1	1	1	1
7011	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	24	1	11	2	0	2	2
9233	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	28	1	12	2	1	10	10
9241	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	44	1	16	2	3	11	11
8265	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	23	1	16	1	1	7	7
9165	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	14	2	9		2	2	2
8912	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	23	1	9	2	1	1	1
9076	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	31	1	16	2	1	7	7
9003	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	22	2	7	2	1	10	10
8911	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	26	1	16	2	1	2	2
9072	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	28	1	4	2	1	2	2
9014	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	21	1	16	2	1	1	1

8837	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	37	1	7	2	1	1	9
9134	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20	1	9	2	1	32	8
9040	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	24	2	16	1	3	1	2
9206	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	25	2	16	2	1	1	1
8859	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	21	1	13	2	3	5	10
9011	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	45	1	12	2	1	1	1
9071	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	30	1	4	2	2	4	2
9028	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	16	1	10	2	3	1	1
8862	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	27	1	10	2	1	2	15
8842	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	34	2	16	1	2	1	2
8943	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	33	1	11	2	2	3	11
8934	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	26	1	9	1	1	3	5
9006	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	20	1	4	1	1	4	2
9173	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	44	1	4	2	2	6	1
8847	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	21	2	11	2	1	13	4
8846	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	45	1	11	1	1	1	1
9231	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	35	1	11	2	1	1	1
7020	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	28	1	16	1	5	1	16
9081	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	21	1	5	2	1	6	11
9033	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	37	1	10	2	1	1	6
9230	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	41	1	4	2	1	1	1
8866	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	51	1	9	2	2	1	11
9098	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	30	1	16	1	2	1	9
9240	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	32	2	16	1	2	2	1
8919	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	25	1	12	2	3	2	7
9079	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	43	1	12	1	1	3	1

8936	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	21	1	16	2	1	1	1
8831	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	31	1	16	2	3	1	11
8923	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	24	1	16	2	2	3	2
7007	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	81	1	9	1	1	1	5
9050	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	21	1	11	2	1	4	2
7018	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	23	1	12	2	2	6	11
8904	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	21	1	11	2	1	1	10
7013	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	24	1	6	2	1	1	8
7017	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	18	1	9	2	1	37	1
8971	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	39	1	9	2	1	5	11
8259	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22	1	12	2	1	1	2
8998	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	22	1	12	2	2	2	1
8868	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	25	1	12	2	1	2	7
8838	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	44	1	9	2	1	1	9
8832	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	37	1	12	1	1	8	7
8257	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	24	1	16	2	2	1	1
8865	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	26	1	16	2	1	1	8
8969	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	27	1	16	1	1	1	11
8845	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	28	1	16	2	1	25	2
8857	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	23	1	10	2	1	1	15
8864	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	23	1	9	2	1	1	8
8860	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	38	1	9	2	3	1	2
8975	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	30	1	11	1	1	2	1
8978	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	44	1	9	2	1	1	1
8973	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	21	1	9	2	1	1	10
9008	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	21	2	12	2	1	1	10

9064	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	19	2	16	2	1	1	1
9051	2	2	2	1	2	2	2	2	2	1	46	1	7	1	1	1	8
9062	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	56	1	4	2	1	1	10
9046	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	18	2	16	2	3	1	10
9054	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	31	1	16	2	2	4	2
9074	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20	1	16	2	1	1	10
9032	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	20	2	16	2	3	2	2
9007	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	25	1	16	2	2	1	7
9191	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	21	1	12	1	2	1	10
9132	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	19	2	12	2	1	2	2
9140	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	25	1	7	2	1	1	2
9185	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	43	1	8	2	1	21	10
9089	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	23	1	12	2	2	6	2
9189	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	41	1	16	2	2	3	7
9147	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	31	1	12	2	1	1	2
9159	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	21	1	9	2	1	1	1
9092	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	25	2	16	2	1	1	9
9195	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	42	1	6	1	1	1	10
9095	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	75	1	4	1	4	1	13

