



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO MULTIDISCIPLINAR EM
PATOLOGIA TROPICAL

Infecção por *Chlamydia trachomatis* em
Gestantes: Prevalência e Importância Pré-natal.

Ana Paula Bomfim de Borborema Alfaia

MANAUS

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ana Paula Bomfim de Borborema Alfaia

Infecção por *Chlamydia trachomatis* em Gestantes: Prevalência e Importância Pré-natal.

Dissertação apresentada para Defesa ao **Programa de Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical** da Universidade Federal do Amazonas, na **área de concentração “Diagnóstico e Controle”** e na linha de pesquisa **“Estratégias para o Controle e/ou Diagnóstico”**.

Orientador: **Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho**

Co-Orientadora: **Prof. Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos**

MANAUS

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

-
- 616..951 Alfaia, Ana Paula Bomfim de Borborema
A385i Infecção por chlamydia trachomatis em gestantes : prevalência
e importância pré natal/ Ana Paula Bomfim de Borborema Alfaia. – Manaus :
[s.n.], 2005
88 f.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade federal do Amazonas,
Mestrado multidisciplinar em patologia tropical.
Orientador: Spartaco Astolfi Filho
Co-orientadora: Cristina Maria Borborema dos Santos
1. Chlamydia Trachomatis 2. Doença sexualmente transmissível
3. Conjuntivite neonatal 4. Prematuridade I. Título
-

Ana Paula Bomfim de Borborema Alfaia

**Infecção por *Chlamydia trachomatis* em Gestantes:
Prevalência e Importância Pré-natal.**

Dissertação apresentada para Defesa ao **Programa de Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical** da Universidade Federal do Amazonas, na **área de concentração “Diagnóstico e Controle”** e na **linha de pesquisa “Estratégias para o Controle e/ou Diagnóstico”**.

Aprovada em 29 de Setembro de 2005.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dr^a Ione Rodrigues Brum
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dr^a Adriana Sotero Martins
Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ

Ao meu esposo e melhor
amigo, companheiro
de todas as horas e aos meus
filhos pais e irmãos
pelo incentivo para realização
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos que Ele me dá, me fortalecendo em todas as horas.

À minha família, por todo incentivo e apoio emocional.

Ao meu orientador Dr. Spartaco Astolfi Filho, pela sua brilhante capacidade, pela sua compreensão e pelo seu apoio para a realização deste estudo.

À minha irmã Cristina pela orientação, ensinamento e amizade, exemplo de perfeição para todas as mulheres que, além de profissionais, também estudam, ensinam e cuidam da casa, da família e dos filhos.

Ao meu amigo Paulo Benevides por estar sempre disposto a contribuir e por todo incentivo e força nos momentos difíceis.

À Dra. Ione Brum pela orientação e apoio no início e no decorrer do estudo.

Ao Dr. Luiz Fernando Passos na pessoa do diretor do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes por ter facilitado o meu acesso ao ambulatório para realização deste projeto.

A todos os residentes de Ginecologia e Obstetrícia que colaboraram na obtenção das amostras.

A todas as gestantes que participaram do estudo pela sua colaboração.

A todos os amigos do laboratório de Biotecnologia no Campus Universitário da Universidade Federal do Amazonas, em especial ao técnico Francisco Carlos Mendes Barbosa pela sua grande contribuição.

As minhas colegas de trabalho do Hospital Universitário Getúlio Vargas, Vera Batista e Palmira Carvalho, pelo apoio que sempre me deram.

Aos meus colegas residentes de pediatria pela compreensão nos momentos em que estive ausente para realização deste projeto.

A todos aqueles que não foram citados mas que se envolveram ajudando na realização e conclusão deste estudo.

RESUMO

Introdução: A infecção por *Chlamydia trachomatis* é uma patologia sexualmente transmitida e de alta prevalência em todo o mundo, particularmente em adultos jovens sexualmente ativos. A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram anualmente, aproximadamente 340 milhões de novos casos de doenças sexualmente transmissíveis curáveis no mundo, entre elas a infecção por *Chlamydia*, sendo 75 a 85% delas em países em desenvolvimento. No Brasil não há cálculo oficial da prevalência da infecção, porém alguns trabalhos mostram taxas de prevalência que variam de 0,6 a 27% em mulheres sexualmente ativas. A infecção por *Chlamydia* envolve o trato genital superior da mulher causando doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, infertilidade; nas gestantes pode resultar em aborto espontâneo, endometrite e salpingite pós-aborto, infecção intra-uterina do feto, natimorto, ruptura prematura de membranas e parto prematuro. No neonato pode causar conjuntivite, infecções de orofaringe, otite média, pneumonia e também tem sido associada à doença pulmonar obstrutiva crônica em crianças. **Objetivos:** O trabalho se propõe a estimar a ocorrência da infecção por *Chlamydia trachomatis* por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), em gestantes no terceiro trimestre que freqüentaram o ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, em Manaus, Amazonas, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005 e observar a possível repercussão desta infecção nas mães e nos seus respectivos recém-nascidos. **Metodologia:** Foi realizado um estudo descritivo em 100 gestantes no terceiro trimestre para estimar a prevalência da infecção genital por *Chlamydia trachomatis*. As gestantes foram mantidas em contato telefônico até a data de sua internação na maternidade para dar início à segunda fase com um estudo observacional, prospectivo, onde 88 mães foram avaliadas quanto à ruptura prematura de membranas, baixo peso ao nascer e evolução durante o período puerperal. Os filhos destas gestantes foram acompanhados até os sessenta dias de vida. **Resultados:** Entre as 100 gestantes que participaram do estudo, 11 apresentaram PCR positivo, nos dando uma prevalência de infecção pela *Chlamydia trachomatis* de 11%. A positividade da *Chlamydia* nas mães não mostrou relação com prematuridade nem baixo peso ao nascer. Uma paciente teve parto cesariano e achado cirúrgico de aderência pélvica e fator tubário. Uma puérpera foi re-internada após uma semana com diagnóstico clínico de endometrite. Um recém-nascido foi natimorto. Nos três casos descritos a mãe tinha PCR positivo para *Chlamydia trachomatis*. Oitenta e sete recém-nascidos foram avaliados: dezesseis (18,4%) apresentaram sintomas

respiratórios, sendo 8 (8/10) expostos e 8 (8/77) não expostos à infecção materna por *C. trachomatis*. Observamos, no presente trabalho, que as crianças expostas têm 7,7 vezes mais chance de desenvolver sintomas respiratórios nos primeiros sessenta dias de vida. **Conclusão:** As doenças sexualmente transmissíveis curáveis, entre elas a infecção por *Chlamydia trachomatis* devem ser investigadas e tratadas, não somente pelo controle da doença no indivíduo tratado, mais também para o controle da transmissão vertical e suas conseqüências.

Palavras chaves: *Chlamydia trachomatis*; doença sexualmente transmissível; conjuntivite neonatal; infecção neonatal; prematuridade; reação em cadeia de polimerase.

ABSTRACT

Introduction: *Chlamydia trachomatis* is a sexually transmitted pathology with high prevalence throughout the world, especially in young adults sexually active. The World Health Organization (WHO) estimates that 340 million new cases of curable sexually transmitted infections occur worldwide, including *Chlamydia trachomatis* infections, 75 - 85% of them in developing countries. In Brazil there is no official number of the prevalence of this sexually transmitted disease, however some studies indicate that the prevalence rate range between 0,6 – 27% in sexually active women. The *Chlamydia trachomatis* infection involves the upper reproductive tract of the women and can cause pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy and infertility. In pregnant women can result in abortion, post-abortal endometritis and salpingitis, intrauterine infection, stillbirth, premature rupture of the membranes and premature birth. In the neonate can cause conjunctivitis, otitis media, and pneumonia and have been associated with chronic obstructive lung disease. **Objective:** To estimate the prevalence of *Chlamydia trachomatis* infection by polymerase chain reaction (PCR), in pregnant women in the third trimester that are attended in the department of low risk pre-natal of the Dona Francisca Mendes University Hospital, in Manaus-AM at January, 10th until June, 30th, 2005 and observe the event of a possible repercussion of this infection on the mothers and their offspring. **Method:** Get studied 100 pregnant women in third trimester to estimate the prevalence of the genital *Chlamydia trachomatis* infection. The pregnant women get in touch with, through a telephone, until she was got to the maternity hospital for start the second phase of the study, where 88 mothers get evaluated for premature rupture of membranes, low-birth weight and evolution for puerperal period. The offspring was accompanied until sixty days of life. **Results:** Among the 100 pregnant that participated in the study, 11 have a positive PCR to get a prevalence rate of *Chlamydia trachomatis* infection for 11%. This study not shows any relationship between maternal *Chlamydial* infection and prematurity or low birth-weight. One patient has a caesarian delivery and has a surgery description of pelvic adherence and tubal factor. One puerperal woman got put into hospital with endometritis. One newborn was stillbirth. On the three cases, the mothers have a positive PCR to *Chlamydia trachomatis*. Eighty seven child was evaluated: sixteen (18,4%) have respiratory symptoms, however, eight (8/10) were exposed and 8 (8/77) were not exposed to maternal *C. trachomatis* infection. We observe, on this study, that the child born to infected mothers experienced 7,7 times more chance to develop respiratory symptoms in the first sixty days of life. **Conclusion:** Curable Sexually Transmitted Infections, including *Chlamydia*

trachomatis infections, have been investigated and treated with the aim to control the vertical transmission and their consequence.

Keywords: *Chlamydia trachomatis*; sexually transmitted infections; neonatal conjunctivitis; neonatal infection; prematurity; polymerase chain reaction.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sorotipos de <i>Chlamydias</i> e doenças correlatas	25
Quadro 2	Doenças causadas por <i>C. trachomatis</i>	25
Quadro 3	Comparação dos produtos da PCR das amostras 10, 30, 31, 40, 58 com a seqüência do plasmídeo de <i>Chlamydia trachomatis</i> .	57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Distribuição segundo os dados sócio-demográficos das gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 58
- Tabela 2 Distribuição segundo o número de gestações anteriores nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 59
- Tabela 3 Distribuição segundo o número de paridade nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 59
- Tabela 4 Distribuição segundo o histórico das doenças sexualmente transmissíveis anteriores à gestação atual nas gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 60
- Tabela 5 Distribuição segundo o exame de VDRL para diagnóstico da sífilis realizado durante a gestação atual nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 61
- Tabela 6 Distribuição segundo a descrição do exame especular das gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 61
- Tabela 7 Distribuição segundo os dados sócio-demográficos em relação ao resultado da *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 62

- Tabela 8 Distribuição segundo a zona urbana de residência das gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM, em relação ao resultado da PCR para *Chlamydia trachomatis*. 63
- Tabela 9 Distribuição segundo o número de aborto em relação ao resultado da PCR para *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 63
- Tabela 10 Distribuição segundo o histórico do tipo de aborto em relação ao resultado da *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 64
- Tabela 11 Distribuição segundo a descrição do exame especular em relação ao resultado da PCR para *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 65
- Tabela 12 Distribuição segundo a ruptura prematura de membrana amniótica em relação a PCR positiva para *Chlamydia trachomatis*, em Manaus-AM, 2005. 66
- Tabela 13 Distribuição segundo a média do capurro somático dos recém-nascidos atendidos em oito maternidades públicas ou conveniadas com o sistema SUS, em relação à infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus-AM, 2005. 66
- Tabela 14 Distribuição segundo o peso de nascimento dos recém-nascidos expostos e não expostos a *Chlamydia trachomatis*, em Manaus-AM, 2005. 67
- Tabela 15 Incidência de sintomas respiratórios no coorte de oitenta e sete recém-nascidos expostos e não expostos a infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus-AM, 2005. 68

Tabela 16	Distribuição segundo o aparecimento de sintomas respiratórios no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação ao tipo de parto na cidade de Manaus-AM, 2005.	69
Tabela 17	Incidência de obstrução nasal no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação à exposição a <i>Chlamydia trachomatis</i> , na cidade de Manaus-AM, 2005.	70
Tabela 18	Incidência de coriza no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação à exposição a <i>Chlamydia trachomatis</i> , na cidade de Manaus-AM, 2005.	70
Tabela 19	Incidência de tosse no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação à exposição a <i>Chlamydia trachomatis</i> , na cidade de Manaus-AM, 2005.	71
Tabela 20	Incidência de taquidispnéia no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação à exposição a <i>Chlamydia trachomatis</i> , na cidade de Manaus-AM, 2005.	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Ciclo de desenvolvimento da <i>Chlamydia Trachomatis</i>	23
FIGURA 2	Escova Cito-brush utilizada para coleta de material endocervical	48
FIGURA 3	Foto de um gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio, evidenciando um fragmento em torno de 270 pb resultante da amplificação da região de microsatélite (GATA) ₁₃ do cromossomo 15 humano, utilizando-se os <i>primers</i> ISO05 <i>forward</i> e <i>reverse</i> .	55
FIGURA 4	Foto de um gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídio, evidenciando um fragmento de 241 pb resultante da amplificação do DNA plasmidial da <i>Chlamydia trachomatis</i> , utilizando-se os <i>primers</i> KL1 e KL2.	56

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Distribuição segundo o resultado da *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 54
- Gráfico 2 Distribuição segundo o tipo de aborto das gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM. 60
- Gráfico 3 Distribuição segundo o aparecimento de sintomas respiratórios em um coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, expostas e não expostas a infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus-AM, 2005. 68

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CD4+	Linfócitos T do tipo CD4
CD8+	Linfócitos T do tipo CD8
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CE	Corpos elementares
cHSP60	Proteína do choque térmico da <i>Chlamydia</i>
CR	Corpos reticulares
CTL	Linfócito T citotóxico
DIP	Doença Inflamatória Pélvica
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Dideoxynucleotídeo
EIA	Enzimaimunoensaio
g	gramas
HSP	Proteína do Choque térmico
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon γ
iNOS	Óxido nítrico sintetase
KCl	Cloreto de potássio
KDO	Ácido 3-deoxi-D-manno-octulosônico
LPS	Lipopolissacáride
mM	Milimolar
M	Molar
mg	miligramas
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade maior
MOMP	Maior proteína da membrana externa
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido Nítrico
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase

Pmol	Picomol
RR	Risco relativo
RNA	Ácido ribonucléico
TE	Tampão de Tris-HCl e EDTA
T _H	Células T <i>helper</i> (auxiliares)
TNF	Fator de necrose tumoral
TPK	Solução de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM e proteinase K 20 mg%
TR	Tampão de ressuspensão
UNG	Uretrite não gonocócica
μL	Microlitro
χ ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 HISTÓRICO	20
1.2 A DOENÇA	22
1.3 EPIDEMIOLOGIA	25
1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	28
1.5 PATOGÊNESE	30
1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	36
1.6.1 DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO	36
1.6.2 PESQUISA DE ANTICORPOS	36
1.6.3 CULTURA DE CÉLULAS	37
1.6.4 DETECÇÃO DE ANTÍGENOS	38
1.6.5 PESQUISA DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	38
1.6.6 TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	39
2. JUSTIFICATIVA	41
3. OBJETIVOS	43
3.1 GERAL	43
3.2 ESPECÍFICO	43
4. METODOLOGIA	44
4.1. MODELO DE ESTUDO	44
4.2 UNIVERSO DE ESTUDO	44
4.2.1 POPULAÇÃO DE REFERÊNCIA	44
4.2.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	44
4.2.3 PARTICIPANTES	45
4.2.3.1 GESTANTES	45
4.2.3.2 RECÉM-NASCIDOS	46
4.3 PROCEDIMENTOS	47
4.3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	47
4.3.2 ACOMPANHAMENTO DOS RECÉM-NASCIDOS	48
4.3.3 MÉTODO DIAGNÓSTICO	48
4.3.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA	49
4.3.3.2 PCR CONTROLE DA INTEGRIDADE DO DNA	49

4.3.3.2.1 SISTEMA DE REACAO DA PCR CONTROLE DA INTEGRIDADE DO DNA	50
4.3.3.2.1 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2,5%	50
4.3.3.3 AMPLIFICAÇÃO DO DNA (PCR) PARA DIAGNÓSTICO DA <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	50
4.3.3.3.1 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE 2%	51
4.3.3.4 SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR	51
4.3.3.4.1 PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO DA REACAO DE SEQÜENCIAMENTO	52
4.3.3.4.2 ANÁLISE DAS SEQÜENCIAS NUCLEOTÍDICAS	52
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
5. RESULTADOS	54
5.1 PRIMEIRA FASE – ESTUDO DE PREVALÊNCIA	54
5.1.1 PCR CONTROLE DA INTEGRIDADE DO DNA	55
5.1.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA (PCR) PARA DIAGNÓSTICO DA <i>CHLAMYDIA TRACHOMATIS</i>	55
5.1.3 SEQÜENCIAMENTO DOS PRODUTOS DA PCR	56
5.1.4 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO	57
5.2 SEGUNDA FASE	65
5.2.1 DADOS MATERNOS E PERINATAIS	65
5.2.2 COORTE DOS RECÉM-NASCIDOS	67
5.3 DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	75
7. BIBLIOGRAFIA	77
7.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
8. ANEXOS	83
8.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	84
8.2 QUESTIONÁRIO	86
8.3 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	87
8.4 EQUIPE CIENTÍFICA	88

1. INTRODUÇÃO

As infecções por *Chlamydia trachomatis* são infecções sexualmente transmissíveis com alta prevalência em mulheres sexualmente ativas constituindo importante problema de saúde pública. Nos Estados Unidos, a infecção genital ocorre frequentemente entre adolescentes sexualmente ativos e adultos jovens. Aproximadamente 75% das mulheres e 50% dos homens são assintomáticos, portanto uma investigação para infecção clamidial tem sido recomendada anualmente, principalmente em mulheres jovens, sexualmente ativas menores de 25 anos ou com múltiplos parceiros (CDC/MMWR, Maio de 2002).

A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram aproximadamente 340 milhões de novos casos de infecção por doenças sexualmente transmissíveis curáveis (gonorréia, infecção por *Chlamydia*, sífilis e tricomoníase) anualmente em todo o mundo, dos quais, 75 a 85% ocorrem em países em desenvolvimento (MAYAUD e MABEY, 2004).

Nos Estados Unidos, em 2003, a prevalência de *Chlamydia* foi de 9,9% (CDC/Sexually Transmitted Disease Surveillance 2003 Supplement, CDC, Outubro de 2004). No Brasil não há cálculo oficial da prevalência da infecção.

1.1 HISTÓRICO

Goh & Forster (1993) em um excelente trabalho sobre doenças sexualmente transmitidas em crianças, fazem uma revisão sobre o histórico da infecção clamídica, o qual descrevemos a seguir:

“-A etiologia da *oftalmia neonatorum* foi pouco entendida até a descoberta do gonococo por Neisser em 1879 o que capacitou Kroner (1884) a sugerir que a oftalmia não gonocócica poderia ser causada por um agente infeccioso desconhecido presente no trato genital feminino.

- Halberstaedter & Von Prowazek (1907) demonstraram a inclusão intracitoplasmática de *Chlamydia* em raspados de conjuntiva de homens e orangotangos com lesões tracomatosas. Por volta de 1909, inclusões intracitoplasmáticas similares foram detectadas em raspados de conjuntiva de recém nascidos com oftalmia e no trato genital de suas mães (Heymann, 1910).

- Fritch *et al.* (1910) fizeram pela primeira vez uma correlação entre as infecções oculares e genitais por *Chlamydia trachomatis*, inoculando a conjuntiva de macacos com secreções dos olhos de crianças com oftalmia por *Chlamydia* e com secreções uretrais de homens com uretrite não gonocócica (UNG). Em todos os casos, os macacos desenvolveram conjuntivite de inclusão com alterações patológicas idênticas independente da fonte de inoculação.

- Tang *et al.* (1957) realizaram o isolamento bem sucedido do agente do trachoma, utilizando o saco vitelino de ovos de galinha para cultura.

- Jones *et al.* (1959) realizaram o primeiro isolamento de *Chlamydia trachomatis*, cultivando microorganismos a partir de material cervical de uma mãe, cujo filho apresentou conjuntivite de inclusão. Isolou-se o parasita do cérvix das mães de crianças com conjuntivite de inclusão e da uretra de seus pais.

- Gordon & Kuan (1965) introduziram procedimento baseado em cultura de tecidos para isolamento da *Chlamydia trachomatis*. Esse método constituiu-se em um avanço notável, que juntamente com a microimunofluorescência para detecção de anticorpos e sorotipagem descoberto por Wang & Grayston (1970) tornaram possíveis estudos epidemiológicos e clínicos das infecções por *Chlamydia*.

- Dunlop *et al.* (1969) demonstraram que era possível utilizar a cultura de espécimes genitais, retinais, oculares e de outras áreas para obter-se o isolamento de *Chlamydia trachomatis*. As dificuldades encontradas para cultura em laboratório impulsionaram as tentativas de se obter métodos sorológicos para o diagnóstico. A princípio, surgiu o teste de fixação de complemento que, entretanto, era pouco sensível para a investigação das infecções superficiais como a conjuntivite de inclusão e a UNG.

- Schachter *et al.* (1975) sugeriram que a *C. trachomatis* poderia causar pneumonia afebril em crianças pequenas.

- Graber *et al.* (1985) analisaram espécimes de pacientes através de culturas de células de Mc Coy e imunofluorescência direta. Os autores demonstraram alta sensibilidade de imunofluorescência direta em seus resultados, já que os pacientes que se mostravam negativos para cultura, apontavam como positivos para imunofluorescência.”

Atualmente, várias técnicas têm sido desenvolvidas para melhorar a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico da *Chlamydia trachomatis*, tais como: ensaio imunoenzimático (EIA), hibridização do DNA e reação em cadeia de polimerase (PCR).

Griffais & Thibon (1989) comprovaram a eficácia da reação em cadeia de polimerase (PCR) para *Chlamydia trachomatis*, verificando ser um método muito sensível na detecção de seqüências específicas de DNA.

Mahony *et al.* (1992) compararam o ensaio imunoenzimático à imunofluorescência direta, à cultura e à PCR, estudando a primeira urina da manhã de homens sintomáticos e assintomáticos. Os autores verificaram que a PCR é uma técnica altamente sensível e altamente específica, tornando-se assim, o método de escolha para o diagnóstico da infecção clamidial.

Outros autores confirmaram esta afirmativa utilizando análise comparativa entre os diversos métodos diagnósticos da infecção (DOMEIKA *et al.*, 1994; CHOUT *et al.*, 1995; VERINGA *et al.*, 1994).

O diagnóstico da infecção por *Chlamydia trachomatis* mantém a cultura de células como padrão ouro, porém, outras técnicas como o ensaio imunoenzimático, imunofluorescência direta, PCR e hibridização do DNA já podem ser utilizados. Comparando-se as diversas técnicas, verificou-se que a reação em cadeia de polimerase é a mais sensível com a vantagem de poder utilizar a urina para análise sem a necessidade de procedimentos invasivos (JONES, 1995).

Desde 1988, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention, nos Estados Unidos) tem apoiado investigação da prevalência e desenvolvido programas para prevenção de doenças sexualmente transmissíveis, em especial a *Chlamydia trachomatis* (CDC/Sexually Transmitted Disease Surveillance 2001 Supplement, Outubro 2002).

Este órgão, o CDC, recomenda que a investigação de infecção por *Chlamydia trachomatis* seja realizada na primeira consulta do pré-natal e anualmente em mulheres menores de 25 anos ou com múltiplos parceiros. Também recomenda a realização do teste durante o terceiro trimestre da gravidez para prevenir complicações maternas pós-natal ou infecção clamidial no lactente (CDC/MMWR, Maio de 2002).

1.2 A DOENÇA

A *Chlamydia* é um parasita procariótico obrigatório de células eucarióticas. É uma bactéria imóvel caracterizada por ter duas fases no desenvolvimento do seu ciclo reprodutivo:

uma forma infecciosa extracelular chamada corpos elementares (CE) e uma forma de inclusão chamada corpos reticulares (CR). Os corpos elementares são partículas infecciosas com 0,2 a 0,5 μm de diâmetro que se aderem e penetram no endossoma da célula hospedeira. Uma vez dentro da célula, os CE se replicam por divisão binária, e se transformam na forma metabolicamente ativa e não infecciosa, os corpos reticulares (CR) que possuem 0,5 a 1,5 μm de diâmetro (Figura 1). Em 36 a 96 horas os CR retornam a forma de CE formando vacúolos contendo 100 a 1000 CE. Quando estes vacúolos preenchem quase todo o citoplasma da célula hospedeira, ocorrem lise e liberação de CE para o meio extracelular, podendo dar início a um novo ciclo de infecção (DEBATTISTA *et al.*, 2003; SCHACHTER & STAMM, 1999).

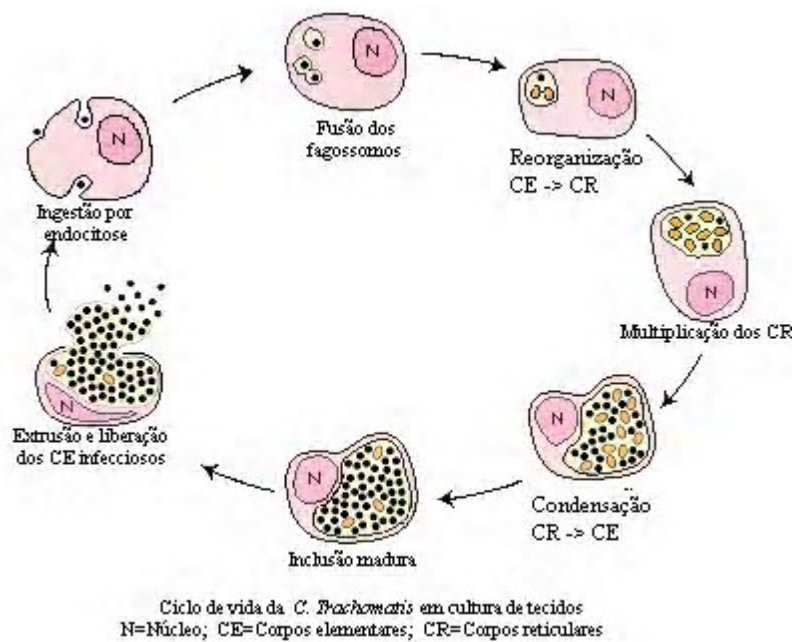


Figura 1 - Ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: NEJM (1995).

Apesar de ser antigenicamente complexa, são dois os antígenos mais relacionados ao diagnóstico e à patogênese da infecção por essa bactéria. São eles: o antígeno lipopolissacarídico (LPS), mais encontrado no CR, constituído principalmente por ácido cetodeoxietanóico; e o antígeno protéico da membrana externa (MOMP), que é o principal componente protéico de superfície tanto nos CE como no CR. Os antígenos da MOMP são espécie específicos, por isso são utilizados para a sorotipagem (SEADI *et al.*, 2002).

Essa bactéria possui restrições metabólicas, sendo incapaz de sintetizar ATP e necessita de fonte externa de energia. Por necessitar da biossíntese do hospedeiro, as *Chlamydias* foram originalmente consideradas como vírus, entretanto, diferentemente dos vírus elas têm parede celular e contém DNA, RNA e ribossomas (MOULDER, 1991).

Este grupo de bactérias pertence a um único gênero: *Chlamydia*, ordem: *Chlamidiales*, família *Chlamydiaceae*. A este gênero pertencem as espécies: *C. trachomatis* e *C. psittaci*, assim como um novo organismo, o TWAR, que recentemente tem sido proposto ser a terceira espécie: *C. pneumoniae*. Todas as três espécies causam doenças em humanos. A *Chlamydia psittaci* infecta uma grande variedade de pássaros e alguns mamíferos, enquanto que a *Chlamydia trachomatis* é limitada a humanos. A *Chlamydia pneumoniae* tem sido relatada em humanos. Não há relato sobre a ocorrência de transmissão sexual relacionada a *C. psittaci* e *C. pneumoniae* (BARON, 2003).

Chlamydia trachomatis pode causar infecções oculares, como o tracoma e infecções urogenitais em homens e mulheres como a uretrite não gonocócica e cervicites mucopurulentas (GOH & FORSTER, 1993).

As infecções urogenitais por *Chlamydia trachomatis* são assintomáticas em até 50% dos homens e 75% das mulheres. Na mulher pode causar salpingite, cervicite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade e gravidez ectópica. Em mulheres grávidas a infecção pode resultar em aborto espontâneo no primeiro trimestre, endometrite e salpingite pós-aborto, infecção intra-uterina do feto, natimorto, ruptura prematura de membranas e parto prematuro. No neonato pode causar conjuntivite de inclusão, infecções em orofaringe, otite média, pneumonia. Outras manifestações em lactentes pequenos (até três meses de idade) têm sido consideradas como: síndrome da morte súbita, doença pulmonar obstrutiva crônica, sendo esta última considerada seqüela a longo prazo da infecção clamidial (MÅRDH, 2002).

Há pelo menos 15 sorotipos diferentes de *C. trachomatis* (tabela 1). Em geral os sorotipos A, B, Ba e C causam tracoma hiperendêmico, sorotipos D, E, F, G, H, I, J e K, infecções oculares e genitais e outras doenças relatadas na tabela 2. Os sorotipos L1, L2, L3 causam linfogranuloma venéreo (SCHACHTER & STAMM, 1999).

Espécies	Sorotipos	Doenças
<i>C. psittaci</i>	L1, L2, L3 e outros	Psitacose, ornitose, aborto, endocardite, pneumonia.
<i>C. pneumoniae</i>	TWAR	Pneumonia.
<i>C. trachomatis</i>	L1, L2, L3	Linfogranuloma venéreo.
<i>C. trachomatis</i>	A, B, Ba, C	Tracoma hiperendêmico.
<i>C. trachomatis</i>	D, E, F, G, H, I, J, K	Infecções oculares e genitais e outras (tabela 2).

Quadro 1 – Sorotipos de *Chlamydias* e doenças correlatas.

FONTE: GOH, B. T.; FORSTER, G. E. (1993).

Neonato	Crianças	Adolescentes/ Adultos
Conjuntivite	Infecção anogenital	Uretrite não gonocócica, cervicite, epididimite,
Rinite	Otite média	bartolinite, salpingite, endometrite, gravidez
Faringite	Miocardite	ectópica, infertilidade, doença inflamatória pélvica,
Pneumonia		Conjuntivite, ceratite, trachoma endêmico, cistite,
Otite média		proctite, perihepatite, doença de Reiter, pneumonia,
Proctite		peritonite.
Prematuridade		
Natimortalidade		

Quadro 2 – Doenças causadas por *C. trachomatis*.

FONTE: GOH, B. T.; FORSTER, G. E. (1993).

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A *Chlamydia trachomatis* é a doença sexualmente transmissível mais comum entre as infecções bacterianas em todo o mundo, particularmente entre pessoas menores de 25 anos que vivem em países industrializados como nos EUA e Inglaterra. Este fato, talvez, esteja relacionado ao maior acesso da população a métodos diagnósticos nestes países (WEINSTOCK *et al.*, 1994).

O Relatório Anual do CDC, 2003 refere que 877.478 casos de infecções por *Chlamydia* foram notificados nos Estados Unidos naquele ano, sendo este número duas vezes

maior que o relato de infecções gonocócicas. No período de 1987 a 2003 o número de casos relatados em mulheres aumentou de 78.5 casos para 466.9 casos por 100.000, isto provavelmente aconteceu devido ao aumento na investigação diagnóstica, ao uso de testes de maior sensibilidade como a amplificação de ácidos nucleicos e também devido ao poder de disseminação da infecção (CDC/Sexually Transmitted Disease Surveillance 2003 Supplement, Outubro 2004).

Em gestantes, nos Estados Unidos é a terceira causa de doença sexualmente transmissível, perdendo apenas para vaginose bacteriana e infecções genitais pelo herpes simples (http://www.cdc.gov/std/healthcomm/fact_sheets.htm).

No Brasil, desconhece-se a incidência da infecção urogenital por *C. trachomatis*, posto que seu diagnóstico é feito por exclusão devido às dificuldades práticas para realização rotineira de diagnóstico laboratorial. Miranda *et al.*, 2003 em um estudo de revisão, refere alguns estudos realizados em populações específicas (por exemplo, ambulatório de ginecologia, clínicas de planejamento familiar, pré-natal), com taxas de prevalência que variam de 0,6% em Porto Alegre a 20,2% em São Paulo, mas que mostram a importância dessa infecção silenciosa em nosso meio.

Ishak *et al.* (1988), acharam uma prevalência de anticorpos IgG anti-clamídia em 53,6% dos soros em Belém, 76,2% em Serra do Norte e em 51,3% nos soros dos índios Xicrins. Títulos elevados de anticorpos ($\geq 1:512$) foram detectados em 7,2%, 42,8% e 15,8% dos soros positivos nas respectivas populações. É válido ressaltar que neste estudo foi utilizado o teste de imunofluorescência indireta usando-se um antígeno imunologicamente semelhante ao sorotipo do linfogranuloma venéreo e que reage sorologicamente com os imunotipos dos grupos B, E e D, comumente associados com a infecção do trato genito-urinário em seres humanos. Este teste utilizado é adequado para triagem de grande número de amostras de soro por ser de metodologia simples e por detectar anticorpos contra os sorotipos mais predominantes; por outro lado, o mesmo não permite a distinção entre cepas que usualmente infectam o olho e o trato genital, ou entre as espécies de *C. trachomatis* e *C. psittaci*.

Em Manaus-AM, Alencar *et al.* (1993), encontraram 27,1% dos exames positivos para *C. trachomatis*, usando imunofluorescência direta e anticorpos monoclonais em esfregaços endocervicais, confirmando a alta prevalência de infecção por *Chlamydia* em mulheres sexualmente ativas.

Santos *et al.* (2003), observaram uma positividade de 20,7% por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em esfregaços endocervicais em mulheres sexualmente ativas na cidade de Manaus-AM.

A prevalência da infecção clamidial em mulheres grávidas é extremamente variável. Trabalhos mostram taxas de 2 a 37% (SMITH & TAYLOR-ROBINSON, 1993; NGASSA & EGBE, 1994; WU SHIXIAO *et al.*, 1999; PAUL *et al.*, 1999; GENCAY *et al.*, 2000; GENCAY *et al.*, 2001).

No Brasil, há um trabalho realizado em Fortaleza-CE que encontrou uma prevalência de 11% nas gestantes estudadas, também utilizando o método da PCR (MARTINS, *et al.*, 2004) e uma dissertação de mestrado relatando uma prevalência de 10,2% em Belo Horizonte-MG (LEITE, 2001).

A recorrência das infecções por *Chlamydia* é comum. Episódios sucessivos de infecção aumentam o risco de desenvolver seqüelas como a infertilidade. Além disso, recentes trabalhos mostraram que mulheres infectadas por *Chlamydia* têm três a cinco vezes mais chance de adquirir o vírus HIV (CDC, Abril 2001).

Em mulheres grávidas a infecção clamidial pode resultar em mau prognóstico da gravidez. Estima-se que aproximadamente 50-75% dos recém nascidos de mães infectadas desenvolvem infecção, sendo a conjuntivite de inclusão a manifestação clínica mais freqüente (20 a 50%). A infecção em nasofaringe parece ser o sítio de infecção mais freqüente porém, geralmente é assintomática. Aproximadamente 30% destas crianças com infecção em orofaringe desenvolverão pneumonia. Infecções assintomáticas da vagina e do reto podem ocorrer em 15% das crianças nascidas de mães infectadas (HAMMERSCHLAG, 1989; GOH & FORSTER, 1993).

A transmissão das infecções neonatais por *Chlamydia* ocorre principalmente por exposição dos neonatos ao endocérvice de mães infectadas durante o parto vaginal. Entretanto, a infecção tem sido demonstrada em recém-nascidos de mães que tiveram partos cesarianos associado com ruptura prematura de membranas. Recentemente, tem sido relatado que a infecção intra-uterina pode ocorrer em mães sem história de ruptura prematura de membranas (GENCAY *et al.*, 2000).

Djukic *et al.* (1996), demonstraram por imunofluorescência indireta a presença de anticorpos IgM anti-clamídia no líquido amniótico, indicando que há transmissão da bactéria por via transplacentária.

Vários trabalhos têm demonstrado a prevalência e algumas conseqüências da infecção clamidial em mulheres grávidas: Paul *et al.* (1999), demonstraram uma prevalência de 17%

em grávidas no segundo trimestre da gestação e 18,6% no momento do parto, porém a incidência de prematuridade e baixo peso ao nascer foram semelhantes entre o grupo de mulheres infectadas e não infectadas; Gencay *et al.* (2000), estudaram a soropositividade associada a natimortos e prematuridade e demonstraram associação entre infecção recente e prematuridade; em outro trabalho, Gencay *et al.* (2001), detectaram DNA de *Chlamydia trachomatis* em secreções conjuntivais, de orofaringe e brônquios em 57% dos recém-natos nascidos de mães infectadas, e sugerem que todas as mulheres grávidas e neonatos prematuros devem ser investigados para *C. trachomatis*; Numazaki *et al.*, 2003, também sugerem a importância de uma investigação e tratamento precoce em mulheres grávidas na tentativa de prevenir as infecções neonatais por *Chlamydia*.

1.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A *Chlamydia trachomatis* pode causar tracoma que é uma infecção de células epiteliais da conjuntiva, resultando na infiltração subepitelial de linfócitos, levando ao desenvolvimento de folículos na conjuntiva palpebral superior e no limbo superior. Secreção mucosa pode estar presente em pequena quantidade. A evolução da infecção pode resultar em cicatrizes conjuntivais, acometimento da córnea com ceratite punctata, opacidade e *pannus* grosseiro, geralmente na região superior da córnea. Os sintomas iniciais são inespecíficos. São relatados: olho vermelho, pequena quantidade de secreção mucóide, sensação de ardor e areia nos olhos e pode haver prurido não muito intenso. Pode causar cicatrizes nas pálpebras, causando a virada dos cílios para dentro (triquíase), resultando em abrasão da córnea que pode levar a cegueira (BARON, 2003).

Chlamydia trachomatis também pode causar uma conjuntivite leve em crianças e adultos que consiste em secreção purulenta da conjuntiva que tem um curso autolimitado, podendo melhorar espontaneamente sem tratamento (BARON, 2003).

No homem, a *Chlamydia* é responsável por 30 a 50% dos casos de uretrite não gonocócica, e, quando não tratada, pode levar a síndrome de Reiter que se caracteriza por apresentar sintomas recorrentes de uretrite, artrite, uveíte e, freqüentemente, lesões de pele e membranas mucosas (WEINSTOCK *et al.*, 1994).

Na mulher a infecção genital pode causar salpingite, cervicite, uretrite, endometrite, doença inflamatória pélvica (DIP), infertilidade e gravidez ectópica. Quando sintomática, observa-se corrimento vaginal, disúria e sangramento após as relações sexuais. A infecção se inicia usualmente pela endocérvice, podendo ocorrer na uretra e no reto.

A cervicite mucopurulenta se caracteriza por apresentar, ao exame especular, uma secreção mucóide amarelada ou turva que vem do endocérvice. A *Chlamydia trachomatis* causa 40-50% dos casos de cervicite mucopurulenta, e 20-50% das mulheres com infecção cervical por *Chlamydia* têm cervicite mucopurulenta (BENNET *et al.*, 1997).

A ascensão do microorganismo do trato genitourinário para o endométrio e trompas de falópio pode ser a causa de dor no baixo ventre e de anormalidades menstruais e, mesmo as infecções assintomáticas podem estar relacionadas à severa imunopatologia tubária, levando ao aumento na incidência de infertilidade em mulheres jovens (WEINSTOCK *et al.*, 1994).

Em mulheres grávidas, há estudos mostrando uma maior incidência de aborto espontâneo, endometrite e salpingite pós-parto, infecções intra-uterinas, natimorto, ruptura prematura de membranas amnióticas e prematuridade (MÅRDH, 2002).

A infecção por exposição perinatal ocorre em aproximadamente, dois terços dos recém-nascidos de mães infectadas. A manifestação clínica mais comum é a conjuntivite que se desenvolve dentro de duas semanas após o nascimento e consiste em secreção ocular, eritema conjuntival e edema que podem ser discretos. Outros locais de infecção são a orofaringe, ouvido médio, pulmões, trato genital, reto e, ocasionalmente, pode levar a rinite (GOH & FORSTER, 1993; MÅRDH, 2002).

Pneumonia causada por *Chlamydia* usualmente ocorre após as primeiras 4 a 12 semanas de idade. Pode ou não haver história prévia de conjuntivite. Geralmente causa sintomas clínicos discretos, com início subagudo o que dificulta o diagnóstico. Tais sintomas são: taquipnéia, febrícula ou ausência de febre. Algumas vezes, se apresenta como sibilância, tosse discreta e congestão nasal, e pode haver crepitações na ausculta pulmonar. A radiografia de tórax mostra um infiltrado intersticial difuso e hiperinsuflação pulmonar. Está associada à eosinofilia e aumento de imunoglobulina sérica. Embora a mortalidade associada a este tipo de pneumonia seja baixa, pode ser necessária a hospitalização prolongada, podendo deixar como seqüela uma deficiência na função pulmonar (GOH & FORSTER, 1993; WEINSTOCK *et al.*, 1994; MÅRDH, 2002).

O papel da infecção por *C. trachomatis* na síndrome da morte súbita do lactente tem sido considerada, porém, maiores estudos devem ser realizados para sua confirmação (MÅRDH, 2002).

Recentemente, a *C. trachomatis* tem sido suspeita como causa de infecções respiratórias baixas em adultos, e muitos casos de pneumonia por *C. trachomatis* tem sido relatado em pacientes imunocomprometidos onde o patógeno tem sido diagnosticado.

Evidências também indicam que *C. trachomatis* podem causar pneumonia ou infecção broncopulmonar em pessoas imunocompetentes (BARON, 2003).

Linfogranuloma venéreo também é uma doença sexualmente transmitida causada por *C. trachomatis*. A doença usualmente ocorre em homens cujo sintoma é o desenvolvimento de linfadenopatia inguinal. A lesão inicial, ou vesículas, aparecem no trato urogenital de homens e mulheres. E se a doença não evoluir espontaneamente para a cura, surgirão linfonodos regionais (BARON, 2003).

1.5 PATOGÊNESE

Chlamydia trachomatis são bactérias intracelulares obrigatórias que infectam células epiteliais do trato genital e conjuntiva. Caracteriza-se por apresentar duas formas distintas no seu desenvolvimento como já relatado anteriormente: os corpos elementares (CE) que são as partículas infectantes e metabolicamente inativas que sobrevivem fora da célula do hospedeiro e os corpos reticulares (CR) que se replicam dentro de vacúolos chamados de inclusão (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

As *Chlamydias* possuem um envelope que é similar aos de certas bactérias gram negativas, que contém uma membrana interna, um espaço periplasmático e uma membrana externa contendo proteínas (MOMP) e lipopolissacarídeo (LPS). Porém, diferentemente das bactérias gram-negativas, o LPS da *Chlamydia* termina com ácido 3-deoxi-D-mannooctulosônico (KDO) e há também pequena quantidade de peptídeoglicano (STEPHENS e LAMMEL, 2001).

A MOMP é o principal componente protéico da superfície e é abundante tanto nos corpos elementares como nos reticulares. É antigenicamente complexa com peso molecular entre 40,000-44,000 Da e constitui aproximadamente 60% do total da proteína de superfície dos corpos elementares. Funcionalmente, a MOMP provavelmente serve como uma porina, regulando o ciclo de desenvolvimento da *Chlamydia* pela passagem de pequenas moléculas através da membrana externa (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

A imunidade em curto prazo que se desenvolve após uma infecção por *Chlamydia trachomatis* é sorotipo específico e definido pela variação dos componentes protéicos da MOMP. A MOMP induz a produção de anticorpos que reconhecem variáveis segmentos na superfície exposta, conseqüentemente a resposta de células B diretamente no sorotipo específico localizados nestes segmentos variáveis da MOMP podem ser críticos para a imunidade. Além disso, as células T *helper* (T_H), importantes para iniciar e manter a resposta

de células B são primariamente estimuladas por peptídeos constantes e apenas um peptídeo variável. A MOMP contém sorotipos específicos para epítomos de células B em quatro regiões variáveis na molécula nas quais a seqüência de aminoácidos varia de acordo com o sorotipo (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

A replicação intracelular necessita de uma íntima associação entre a bactéria e o hospedeiro que provavelmente envolve alterações na função celular do hospedeiro a fim de estabelecer e manter o meio ideal para replicação dentro da inclusão. Além disso, esta bactéria possui restrições metabólicas sendo incapaz de sintetizar ATP e, portanto, necessita de fonte de energia da célula hospedeira (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

O fato da *Chlamydia* se desenvolver no interior da célula, influencia na resposta inflamatória do hospedeiro. Há fortes evidências no envolvimento da imunidade mediada por células (LOOMIS & STARNBACH, 2002).

A imunidade mediada por células compreende aos linfócitos T que são divididas em duas categorias: T CD4+ ou T CD8+. Em geral os linfócitos T CD4+ consistem em células T *helper* (T_H) que atuam na resposta imunológica, principalmente através da secreção de citocinas, enquanto os linfócitos T CD8+ são linfócitos T citotóxicos. As células T CD4+ podem ser divididas em dois subgrupos denominados T_{H1} e T_{H2}, baseando-se nas citocinas que produzem. Células T_{H1} produzem interleucina 2 (IL-2), interferon γ (INF- γ), e fator de necrose tumoral (TNF) enquanto as células T_{H2} secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (JANEWAY *et al.*, 2002).

As células T_{H1} são responsáveis pelo controle de células T CD8+ citotóxicas. Sua produção é estimulada por macrófagos, IL-12 ou INF- γ , e é suprimida pela IL-4. As células T_{H2} são estimuladas por IL-4 e suprimidas pelo INF- γ . As citocinas induzidas pelas células T_{H2} induzem aumento na produção de anticorpos pelas células B e mudança para produção de diferentes isotipos de imunoglobulinas (imunidade humoral), bem como a diferenciação e ativação dos eosinófilos e mastócitos. A imunidade humoral é primariamente responsável pela neutralização e eliminação do patógeno extracelular através da ativação de linfócitos B para secretar IgM e outros anticorpos. Imunidade celular envolve a destruição de células infectadas por linfócitos T citotóxicos, ou a destruição de patógenos intracelulares por macrófagos ativadas pelas células T_{H1} (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Na fase inicial da infecção, a imunidade humoral na forma de IgA secretória desempenha a maior defesa contra a proteína da membrana externa (MOMP) da bactéria, e parece ter um papel importante na resposta imune, determinando se a infecção vai se

desenvolver ou evoluir para a cura. Esta proteção da resposta imune à infecção é associada com determinantes antigênicos específicos na MOMP (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Se a bactéria não for debelada pela resposta imune humoral inicial, o patógeno se estabelece como parasita intracelular dentro do tecido do hospedeiro. Desta forma, somente a produção de anticorpos não é adequada para resolver a infecção aguda (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

A resposta do hospedeiro à infecção aguda ocorre dentro de 1 a 2 dias e se caracteriza pela inflamação e infiltração da mucosa com neutrófilos, linfócitos T e monócitos. Há migração de grande número de neutrófilos para o sítio da infecção que destroem os corpos elementares acessíveis, enquanto que os linfócitos T se acumulam e controlam a infecção através da estimulação da imunidade mediada por células (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

A imunidade mediada por células (T_H1) através da liberação de citocinas tais como IL-2, IL-12, e $INF-\gamma$ podem tornar-se predominantes, levando a uma resposta protetora efetiva para a resolução da infecção, pela destruição de células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos ($CD8+$), fagocitose de corpos elementares livres pelos macrófagos ativados ou ação direta sobre a *Chlamydia* pelo $INF-\gamma$ e TNF no metabolismo bacteriano (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Entretanto, deve ocorrer de fato, um equilíbrio entre as respostas T_H1 e T_H2 que promovem uma resposta protetora ideal. Linfócitos T e B interagem sinergicamente reconhecendo os antígenos bacterianos e as superfícies das células infectadas por anticorpos específicos e subseqüentemente lise da célula infectada pelo anticorpo. Além disso, a produção de anticorpos pode inativar os CE livres, prevenindo um novo foco de infecção (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

As células T $CD8+$ têm mostrado ser citolíticas para as células infectadas por *Chlamydia* “in vitro”. Entretanto, a *Chlamydia* parece suprimir a expressão dos antígenos de histocompatibilidade maior (MHC) da classe I e II induzidos pelo INF. Suprimindo a síntese MHC classe I, a bactéria escapa do processo e apresentação na superfície das células e subseqüente lise pelos linfócitos T citotóxicos. Conseqüentemente, a *Chlamydia* escapa da resposta imune e estabelece uma infecção persistente (DEBATTISTA *et al.*, 2003). Um dos mecanismos pelo qual ocorre esta supressão, é que a *Chlamydia* pode secretar no citoplasma da célula hospedeira, uma molécula com atividade semelhante ao proteassoma que inibe a transcrição dos fatores RFX5 e USF-1, os quais são necessários para a transcrição das moléculas de MHC da classe I e II, respectivamente (ROTTENBERG *et al.*, 2002).

Alternativamente, a resposta T_{H1} excessiva, resulta na falência na imunoregulação e maior liberação de citocinas inflamatórias, o que pode levar a uma destruição tecidual significativa pela ação dos linfócitos T citotóxicos (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Por outro lado, se a resposta T_{H2} é predominante, e a ativação de linfócitos T citotóxicos é insuficiente além da deficiência na secreção de IL-2, IL-12 ou INF- γ , a proliferação de macrófagos é insuficiente para destruir a bactéria, favorecendo a condição de infecção crônica (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

O INF- γ pode inibir diretamente o crescimento da *Chlamydia* dentro da células infectadas por pelo menos 3 mecanismos: primeiro o INF- γ induz a expressão de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma enzima do hospedeiro que degrada o triptofano intracelular. Como a *Chlamydia* tem pouca ou nenhuma habilidade para produzir seu próprio triptofano, a indução da IDO pelo INF- γ pode limitar o crescimento intracelular da *Chlamydia*. Segundo, o INF- γ auto-regula a produção de óxido nítrico sintetase (iNOS), que cataliza a produção de vários substratos intermediários do nitrogênio, entre eles o óxido nítrico (NO). O NO tem sido identificado como uma importante defesa molecular contra patógenos bacterianos e tem sido demonstrado que restringe o crescimento da *Chlamydia* “in vitro”. Terceiro, o INF- γ regula a expressão do receptor da transferrina na superfície das células infectadas, resultando na deficiência de ferro intracelular que também pode limitar a replicação da *Chlamydia trachomatis* (LOOMIS & STARNBACH, 2002). O TNF pode similarmente ao INF- γ aumentar a atividade da indoleamina 2,3-dioxigenase (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Vários trabalhos (KINNUNEN *et al.*, 2002; KINNUNEN *et al.*, 2003; DEBATTISTA *et al.*, 2003) mostram que infecções persistentes estão relacionadas com aumento dos níveis da expressão da proteína do choque térmico da *Chlamydia* (cHSP60) enquanto há um declínio nos níveis da MOMP.

A proteína do choque térmico (HSP) também é produzida por células humanas no meio intracelular, e parece ter uma função essencial para a sobrevivência celular, prevenindo a desnaturação de proteínas ou agregação anormal durante períodos de stress, ajudando na preservação da estrutura das proteínas celulares. Também são responsáveis pela síntese, agregação e acondicionamento de novas proteínas mantendo as funções nas células normais (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

A proteína do choque térmico da *Chlamydia* (cHSP60) exhibe mais que 80% de homologia entre espécies de *Chlamydia*, 60% de identidade com outras bactérias e 50% de homologia com proteína choque térmico de células eucarióticas de algumas plantas e animais.

Na *Chlamydia*, está envolvida com a produção da membrana externa dos corpos elementares, de onde pode ser isolada, durante a mudança de corpos reticulares intracelulares para os compactos corpos elementares. Pode também desenvolver uma função protetora ao patógeno para evasão das defesas do hospedeiro (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Células necróticas levam a liberação de uma potente proteína biológica, a proteína do choque térmico (HSPs) para o meio extracelular. Esta liberação, estimula diretamente os macrófagos a secretar citocinas e as células dendríticas a expressar as moléculas de MHC da classe I e moléculas co-estimuladoras. A liberação de grande quantidade de HSPs para o meio extracelular serve como sinal de desintegração celular (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

O mecanismo pelo qual a cHSP60 induz a patologia tem sido explicado de diversas formas. A exposição contínua a cHSP60 poderia promover a doença crônica através da estimulação antigênica direta ou ainda pela ativação de macrófagos (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Um mecanismo tem sido proposto para explicar a patogênese da infecção crônica: receptores para HSP60 são expressos por macrófagos ativados e células teciduais. Isto estimularia a produção de citocinas inflamatórias como o INF- γ . Além disso, a liberação de radicais livres de oxigênio durante o curso de uma inflamação pelos macrófagos pode estimular a produção de HSP pela célula do hospedeiro como meio de proteção própria. Em resposta ao aumento na produção de HSP pelo hospedeiro e pelo patógeno, e à reação inflamatória e liberação de radicais livres de oxigênio ocorrem alterações na temperatura, pH e pressão parcial de oxigênio assim como nos mecanismos de resistência natural do hospedeiro como a fagocitose, favorecendo a evolução para infecção crônica (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Há ainda, a possibilidade de dano tecidual auto-imune em consequência da reação cruzada da cHSP60 expressada na superfície das células infectadas e a expressão aumentada de HSP humana induzida secundariamente ao dano inflamatório induzido pelos linfócitos T citotóxicos (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Além disso, a HSP humana é fisiologicamente expressa pelo embrião na decídua durante os estágios de pré e peri-implantação na gravidez. Na presença de infecção crônica, pode haver reação cruzada de anticorpos contra cHSP60 com o HSP humano, dificultando a implantação do embrião e favorecendo ao aborto (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

O mecanismo de reação cruzada entre a HSP humana e clamidial pode também promover mecanismo de imunoregulação: o organismo reconhece como HSP própria, o que

poderia ser uma estratégia que contribuiria para o estabelecimento ou manutenção da autotolerância e o controle de respostas inflamatórias (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

A expressão aumentada de HSP pode desenvolver um importante papel imunorregulador, diminuindo a expressão de células T_H1 através da estimulação de IL-10 e a expressão de células T_H2, o que poderia favorecer ao controle da resposta inflamatória (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Em um recente trabalho, Kinnunen *et al.* (2003) estudaram a indução da produção de INF- γ e IL-10 pela proteína do choque térmico da *Chlamydia* (cHSP60), e sugeriram que esta proteína pode desempenhar um papel importante na regulação da resposta imune observada em pacientes com infecções crônicas por *Chlamydia trachomatis*.

Por outro lado, exposições repetidas à HSP60 poderiam levar a reação cruzada com HSP humana com indução precoce de IL-10, que tem um efeito inibitório sobre as citocinas pro inflamatórias como IL-2 e INF- γ e regulação negativa das moléculas de MHC da classe I e II, o que poderia favorecer a diminuição da resposta T_H1 antes da resolução da infecção, resultando, portanto, em uma maior vulnerabilidade à seqüelas (KINNUNEN *et al.*, 2003).

A infecção por *Chlamydia* no trato genital tem sido associada com aumento na taxa de transmissão do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Isto pode ocorrer tanto pela inflamação induzida pela *Chlamydia* que resulta no recrutamento de células T CD4+ para o trato genital (aumentando o número de células alvo do HIV), como pela reação inflamatória induzida pela *Chlamydia* que pode estimular a replicação viral (facilitando a transmissão) (SCHACHTTER & STAMM, 1999).

O mecanismo real da patogênese pelo qual a infecção por *C. trachomatis* progride da fase aguda para a crônica ainda não está completamente esclarecido. Este mecanismo parece estar intimamente relacionado com o equilíbrio entre os mecanismos de defesa do hospedeiro e o patógeno. Vários fatores interligados parecem ter seu papel: fatores genéticos, endócrinos, perfil das citocinas, infecções prévias, virulência do patógeno ou a quantidade do inóculo, a presença de outras infecções genitais e a via de infecção (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

Portanto, o perfeito equilíbrio da resposta imune juntamente com os fatores citados acima parece determinar o prognóstico da infecção (DEBATTISTA *et al.*, 2003).

1.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Entre os testes laboratoriais disponíveis para a detecção direta da *Chlamydia* estão a cultura de células, a imunofluorescência direta, o ensaio imunoenzimático (EIA), a sonda de DNA e as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos que apresentam maior sensibilidade. Há ainda testes diagnósticos indiretos através da pesquisa de anticorpos como a imunofluorescência indireta além do exame citológico para detecção das inclusões citoplasmáticas (SEADI *et al.*, 2002).

Independentemente do método de detecção direta e da amostra clínica utilizada, a coleta adequada é essencial e se relaciona, diretamente com a sensibilidade e especificidade do teste diagnóstico (SEADI *et al.*, 2002).

1.6.1 Diagnóstico citológico

A conjuntivite de inclusão em recém-nascidos e o tracoma ocular podem ser identificados em esfregaços da conjuntiva, corados pelo Giemsa, apresentando inclusões intracitoplasmáticas típicas. Esta técnica não tem boa sensibilidade, principalmente nos casos em que a doença se apresenta de uma forma mais branda. Todavia, essas formas de inclusão estão presentes podendo ser encontradas em 10-30% dos esfregaços coletados na fase ativa do tracoma. Os esfregaços de recém-nascidos com conjuntivite de inclusão apresentam uma porcentagem maior de positividade quando comparados com esfregaços de adultos com conjuntivite (SCHACHTER & STAMM, 1999).

A citologia também tem sido utilizada para avaliar esfregaços endocervicais, incluindo aqueles obtidos para o Papanicolau. A interpretação é difícil e a sensibilidade e especificidade são baixas (SCHACHTER & STAMM, 1999).

Geerling *et al.* (1985), estudaram 200 esfregaços cervicais de mulheres jovens e compararam os resultados com cultura de células, concluindo que devido a alta incidência de resultados falso-positivos, os esfregaços citológicos corados pelo Papanicolau não são um efetivo método diagnóstico para a infecção clamidial.

1.6.2 Pesquisa de anticorpos

As técnicas sorológicas mais comuns, como a fixação do complemento, a imunofluorescência indireta, que utiliza células infectadas com o sorotipo L2, e o

enzimaimunoensaio heterogêneo, que utiliza antígenos recombinantes, detectam anticorpos gênero-específicos, ou seja, contra o antígeno LPS presente nos corpos elementares ou reticulares (SCHACHTER & STAMM, 1999).

As técnicas que permitem detectar separadamente anticorpos de classe IgG, IgA, IgM são mais úteis, embora a pesquisa de IgM seja freqüentemente indetectável quando a infecção é recorrente. A presença de anticorpos IgM e/ou IgA e um aumento significativo (pelo menos dois títulos) de IgG entre uma amostra colhida na fase aguda e outra na convalescente evidenciam uma infecção recente (SCHACHTER & STAMM, 1999).

A microimunofluorescência para pesquisa de anticorpos é espécie e subespécie-específica (WANGS *et al.*, 1973 apud SEADI *et al.*, 2002). É o método de escolha para a pesquisa do anticorpo IgM no diagnóstico da pneumonia por *Chlamydia* no recém-nascido e a mais sensível entre as técnicas sorológicas, mas é laboriosa e de alto custo (SCHACHTER & STAMM, 1999).

A sorologia é recomendada para estudos epidemiológicos e infecções sistêmicas, como pneumonia em recém-nascidos, linfogranuloma venéreo, salpingites, epididimites, infertilidade, gravidez ectópica, onde os títulos de anticorpo IgG são freqüentemente elevados (SEADI *et al.*, 2002).

1.6.3 Cultura de células

Várias linhagens celulares permitem o cultivo da *Chlamydia*, sendo mais utilizadas as células McCoy distribuídas em monocamadas sobre microplacas. Para verificar a positividade do teste, através da presença de inclusão citoplasmática constituída de CE e CR, cora-se o tecido cultivado preferencialmente com anticorpo monoclonal fluorescente. Outros métodos de visualização das inclusões podem ser utilizados, mas a imunofluorescência com anticorpos monoclonais constitui a técnica mais sensível para detecção das inclusões (BLACK, 1997 apud SEADI *et al.*, 2002).

A vantagem da cultura é a baixa probabilidade de contaminação e a preservação do microorganismo para estudos adicionais, como o teste de susceptibilidade à terapia antimicrobiana e genotipagem. Apresenta como desvantagem a necessidade de infra-estrutura de laboratório muito onerosa. Além disso, esta cultura é trabalhosa, exige cuidados na conservação da amostra (microorganismos viáveis). Por isso, embora a especificidade seja elevada, a sensibilidade fica em torno de 70 a 90% (WEINSTOCK *et al.*, 1994).

1.6.4 Detecção de Antígenos

Os testes de detecção de antígenos baseiam-se na reação com os antígenos contidos no LPS e na MOMP.

A visualização direta das estruturas antigênicas da *Chlamydia* através da imunofluorescência direta, pode ser realizada utilizando-se anticorpos monoclonais fluorescentes dirigidos aos CE e CR. Além disso, a imunofluorescência direta possibilita avaliar simultaneamente a adequação da amostra. Este método, tem uma sensibilidade em torno de 85% e uma especificidade de 98% em relação a cultura, quando ambas são realizadas em condições ótimas. A desvantagem do método é a necessidade de um microscopista treinado e a dificuldade em se processar um grande número de amostras. A experiência na interpretação da imunofluorescência é fundamental, porque a ligação inespecífica do anticorpo a outros microorganismos pode ocorrer, levando a um resultado falso-positivo (WEINSTOCK *et al.*, 1994).

O ensaio imunoenzimático (EIA) utiliza anticorpos monoclonais e policlonais que detectam os LPS da *Chlamydia*. Os anticorpos são conjugados com a enzima e reagem com o substrato que produz uma coloração se a *Chlamydia* estiver presente. A maior desvantagem deste método é que os anticorpos podem reagir com LPS de outras espécies de bactérias achadas no trato genito-urinário, e portanto, produzir um resultado falso-positivo. Utilizando-se um tratamento das amostras positivas com anticorpo bloqueador e obtendo-se um resultado negativo para estas amostras tratadas, confirma-se o resultado positivo. A especificidade da técnica com anticorpo bloqueador é de 99,5% (SCHACHTER & STAMM, 1999).

1.6.5 Pesquisa de Ácidos Nucléicos

A partir de 1980, a tecnologia de detecção de ácidos nucleicos encontrou ampla aplicação no diagnóstico de infecção por *Chlamydia*, por ser mais rápida e sensível e por não depender da viabilidade da amostra (SEADI *et al.*, 2002).

Sondas de DNA com sequência complementar ao RNA ribossomal 16S do genoma da *Chlamydia* e marcadas com éster de acridina, ao hibridizar com o DNA da *Chlamydia*, são absorvidas por magnetismo, e a reação é quantificada com o uso de um luminômetro. Amostras hemolisadas são inadequadas devido ao efeito de autofluorescência, podendo produzir resultados falso-positivos (BLACK, 1997 apud SEADI *et al.*, 2002).

1.6.6 Testes de Amplificação de Ácidos Nucléicos

As técnicas de amplificação detectam com rapidez pequenas quantidades de ácidos nucleicos em amostras clínicas. A amplificação do DNA ou RNA consiste na obtenção de milhares de cópias de um segmento de DNA a partir de *primers* (iniciadores) de uma seqüência de DNA-alvo. Os primers definem as regiões de DNA a serem amplificadas e a especificidade da técnica (QUINN *et al.*, 1996).

A sensibilidade dos testes de amplificação de DNA é em torno de 20% maior do que a da cultura de células, da imunofluorescência direta e do enzimaímunoensaio.

Os testes comerciais de amplificação de DNA aprovados pelo FDA são: a *ligase chain reaction* (LCR), o *transcription-mediated amplification assay* (TMA) e a *polymerase chain reaction* (PCR). A PCR e LCR amplificam uma seqüência de nucleotídeos, e a TMA é dirigida ao rRNA da *Chlamydia* (SCHACHTER & STAMM, 1997).

A técnica que está sendo utilizada há mais tempo é a PCR. Esta técnica consiste em produzir grande quantidade de DNA em poucas horas, onde uma determinada seqüência do DNA, que se encontra em quantidades inferiores a picogramas, pode ter sua quantidade reproduzida na ordem de microgramas. A reação de PCR utiliza diferentes temperaturas para reproduzir a replicação de determinada seqüência de DNA “*in vitro*”. Essa amplificação “*in vitro*” ocorre quando um par de oligonucleotídeos (pequenas moléculas de DNA fita simples, utilizadas como iniciadores ou “primers”), uma DNA polimerase termoestável, dNTPs (dideoxinucleotídeos) como substrato e tampão em condições iônicas adequadas são colocadas em um mesmo sistema e submetidas a condições peculiares para que possa se processar a reação. Os oligonucleotídeos delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação e são sintetizados, artificialmente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Um ciclo de amplificação é composto de três etapas: desnaturação, anelamento e extensão.

A etapa de desnaturação onde a dupla fita de DNA alvo é convertida através da elevação da temperatura para 92-96°C em fitas simples, na presença dos *primers*, dos quatro desoxinucleotídeos trifosfatados e da polimerase (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

A etapa de anelamento consiste na hibridização dos *primers* ao DNA alvo da reação de amplificação. Nesta fase, a temperatura é rapidamente reduzida para 35-70°C, dependendo

essencialmente do tamanho e seqüência do *primer* utilizado (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

A etapa de extensão ou polimerização é a realizada pela enzima Taq DNA polimerase que insere os dNTPs complementares à seqüência de DNA alvo. Esta fase ocorre a uma temperatura de 72°C que é a temperatura ótima da enzima (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Este ciclo é repetido dezenas de vezes e normalmente são empregados 30 a 50 ciclos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

A técnica da PCR tem sido aplicada na identificação de diversos patógenos em amostras clínicas, o que comprova alta sensibilidade e especificidade da técnica, pois uma determinada seqüência de DNA, que se encontra em pequena quantidade, pode ser amplificada mesmo que esteja misturada ao DNA do genoma do hospedeiro e/ou outros organismos. Essa característica tem servido como base para o diagnóstico de várias doenças infecciosas (PERSING, 1993).

A especificidade e a sensibilidade da técnica da PCR dependem dos “primers” utilizados, do sistema de amplificação, do tipo de material, da população a ser analisada, da preparação da amostra e do método de detecção do produto amplificado. SCHACHTER & STAMM (1999), referem que a PCR, juntamente com a cultura de células constituem o padrão-ouro para o diagnóstico da *Chlamydia*.

Roosendaal *et al.*, 1993, compararam a utilização de diferentes *primers* (um *primer* de plasmídeo, um *primer* que amplifica o gene da MOMP e um *primer* direcionado ao RNAr) para a detecção de *Chlamydia trachomatis* por Reação em Cadeia de Polimerase com a cultura de células e concluíram que os *primers* que amplificam a região plasmidial, apresentam melhor sensibilidade para serem utilizados em programas de investigação da infecção, já que a *Chlamydia trachomatis* apresenta de 6-10 plasmídios por bactéria, aumentando assim o seu alvo.

Mahony *et al.*, 1993, também compararam cinco diferentes tipos de *primers* utilizados no diagnóstico da *C. trachomatis*: dois que amplificam o plasmídeo, dois que amplificam a MOMP, e um que amplifica o DNA ribossomal (RNAr) e concluíram que os *primers* de plasmídeos são de 10 a 1000 vezes mais sensíveis que os cromossomais.

JUSTIFICATIVA

A infecção por *Chlamydia trachomatis* é atualmente a doença sexualmente transmissível mais freqüente nos países desenvolvidos. Estima-se que 3 milhões de casos novos ocorram anualmente nos Estados Unidos (CDC/MMWR, Outubro de 2002).

A infecção por *Chlamydia* pode ser levemente sintomática ou assintomática em aproximadamente 50% dos homens e 75% das mulheres (CDC/MMWR, Maio 2002). Quando diagnosticada e tratada pode ser facilmente curada. Porém infecções não diagnosticadas e não tratadas podem causar infertilidade, doença inflamatória pélvica e gravidez ectópica. Há evidências que a infecção por *Chlamydia trachomatis* na gravidez pode resultar em mau prognóstico: aborto, infecção neonatal intra-uterina, natimorto, prematuridade, ruptura prematura de membranas e endometrite pós-parto (MÅRDH, 2002).

Mais de 40% das mulheres com infecções por *Chlamydia* não tratadas podem evoluir com doença inflamatória pélvica, destas 20% vão se tornar inférteis, 18% vão ter dor pélvica crônica e 9% podem ter gravidez ectópica (Centers for Disease Control and Prevention – CDC, Abril 2001).

Infecções por *Chlamydia trachomatis* em mulheres grávidas podem estar relacionadas com partos prematuros e complicações perinatais. Embora a transmissão perinatal esteja mais relacionada a partos vaginais com contaminação do recém-nato no momento da passagem pelo canal do parto, a possibilidade de infecção intra-uterina tem sido relatada (NUMAZAKI & NIIDA, 2000 e DJUKIC *et al.*, 1996).

Gencay *et al.* (2000) estudaram a soropositividade da *Chlamydia trachomatis* associada a natimortos e partos prematuros e concluíram que anticorpos IgG para *Chlamydia trachomatis* foram freqüentemente detectados em mães com recém nascidos natimortos, sugerindo infecção passada, enquanto que mães que tiveram parto prematuro tinham, com maior frequência, anticorpos IgM, sugerindo infecção aguda. Ngassa *et al.* (1994) também

concluíram que há um risco significativo de trabalho de parto prematuro na presença de infecção clamidial em mulheres grávidas.

Paul *et al.* (1999), estudaram a prevalência e a importância pré-natal das infecções por *Chlamydia* e concluíram que a infecção por *Chlamydia trachomatis* é relativamente comum em mulheres grávidas (prevalência de 17%), porém não encontraram associação com prematuridade e baixo peso.

Infecções maternas por *Chlamydia trachomatis* têm sido relacionadas com aumento na morbidade em neonatos e lactentes até 3 meses de idade. Aproximadamente dois terços de recém-natos nascidos por via vaginal de mães infectadas tornar-se-ão infectados durante o nascimento (WEINSTOCK *et al.*, 1994). Estas infecções podem resultar em conjuntivite, otite média, faringite e pneumonia no recém-nato. Além disso, a infecção neonatal por *Chlamydia trachomatis* pode causar seqüela em longo prazo, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (MÅRDH, 2002).

A detecção desta infecção é importante, não apenas no intuito de controlar a transmissão sexual, mas porque pode levar a sérias complicações nas mulheres sexualmente ativas e nas gestantes e, além disso, contribuir para a morbidade de crianças até três meses de idade.

Em gestantes, a infecção por *Chlamydia trachomatis* é a terceira causa de doenças sexualmente transmissíveis nos EUA (CDC, STDs & Pregnancy. Facts Sheet, http://www.cdc.gov/std/healthcomm/facts_sheets.htm, acesso em 30.08.2005). No Brasil, os poucos trabalhos que existem já demonstram uma prevalência significativa o que é preocupante devido a conseqüências que podem advir desta infecção principalmente em mulheres jovens em idade reprodutiva com possíveis complicações para o neonato, daí a necessidade de se fazer à investigação diagnóstica como uma medida de controle da doença.

Assim, devido à baixa incidência de sintomas e a grande importância para a saúde pública, faz-se necessário o diagnóstico com um teste de alta sensibilidade para a detecção desta bactéria, como, por exemplo, os testes de amplificação de ácidos nucléicos e, entre eles, a PCR.

Com os dados mencionados acima e por considerar a infecção clamidial de grande importância epidemiológica em saúde pública, há necessidade de aprofundar o estudo de tal infecção em mulheres grávidas, e observar a possível repercussão desta infecção nas mães puérperas e em seus descendentes.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estimar a ocorrência de *Chlamydia trachomatis* em mulheres gestantes no último trimestre, que freqüentem o ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário D. Francisca Mendes, em Manaus, estado do Amazonas e observar a possível repercussão desta infecção materna nos recém-nascidos.

2.2 ESPECÍFICO

- Investigar a presença de *Chlamydia trachomatis*, por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), na população estudada.
- Estudar a ocorrência de prematuridade e morbidade neonatal em recém-nascidos expostos e não expostos à infecção materna por *Chlamydia trachomatis*.
- Avaliar a incidência de sintomas respiratórios nos primeiros sessenta dias de vida nos recém-nascidos expostos e não expostos à infecção materna por *Chlamydia trachomatis*.
- Identificar possíveis fatores sócio-demográficos que possam estar associados à infecção genital por *Chlamydia trachomatis*.
- Avaliar a relação da infecção por *Chlamydia trachomatis* com ruptura prematura de membranas e baixo peso ao nascer.
- Avaliar a ocorrência de histórias anteriores de abortos espontâneos nas mães com exame positivo para *Chlamydia trachomatis*.

4. METODOLOGIA

4.1 MODELO DE ESTUDO

A primeira parte do estudo, trata-se de um estudo descritivo, para estimar a prevalência da infecção genital por *Chlamydia trachomatis* em mulheres gestantes no terceiro trimestre através da detecção do agente etiológico por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e a segunda fase, trata-se de um estudo observacional, prospectivo, que se propõe a avaliar possíveis repercussões da infecção materna no parto, no concepto e nas mães durante o período puerperal a também acompanhar os respectivos recém-nascidos até os sessenta dias de vida.

4.2 UNIVERSO DE ESTUDO

4.2.1 População de Referência

O estudo teve como alvo inicial a população de gestantes que procuraram o ambulatório de pré-natal do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, situado na zona norte de Manaus, estado do Amazonas e seus respectivos recém-nascidos em oito maternidades públicas ou conveniadas com o Sistema Único de Saúde na cidade de Manaus, estado do Amazonas.

4.2.2 População de Estudo

Inicialmente foram estudadas 100 pacientes gestantes no terceiro trimestre (a partir de 29 semanas de idade gestacional) que frequentaram o ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário D. Francisca Mendes, na cidade de Manaus, estado do Amazonas, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005.

O ambulatório de pré-natal do Hospital Universitário D. Francisca Mendes é subdividido em três: pré-natal de baixo risco, de alto risco e de adolescente. Atende a uma demanda de aproximadamente 400 gestantes por mês e destas, em torno de 65% são do pré-natal de baixo risco.

A demanda das pacientes do pré-natal de baixo risco ocorre de forma espontânea, sendo, em sua grande maioria, moradoras da zona norte e leste de Manaus, enquanto que, as pacientes de alto-risco e adolescente são encaminhadas do baixo risco ou de outros serviços externos.

A classificação feita como gestante de baixo risco é dada no atendimento inicial da paciente ou no decorrer da sua gravidez se esta apresentar algum problema, tais como: diabetes gestacional, hipertensão arterial ou doenças crônicas diagnosticadas anteriormente à gravidez, será, neste caso, encaminhada ao ambulatório de pré-natal de alto risco. O ambulatório pré-natal de adolescente é reservado para gestantes com idade até 18 anos.

O presente trabalho foi realizado somente com as mães do baixo risco, devido a uma maior possibilidade de ocorrências de prematuridade e morbidade neonatal nas adolescentes e nas gestantes que apresentam algum fator de risco na gravidez o que poderia levar a resultados duvidosos por fatores de confusão.

Estas mães foram mantidas em contato pelo telefone até o momento de sua internação na maternidade, para dar início à outra fase do estudo, onde foram acompanhados durante o período puerperal (quarenta dias) 88 das 100 gestantes que participaram do estudo inicial e 87 crianças, filhos das respectivas mães, por um período de sessenta dias.

4.2.3 Participantes

4.2.3.1 Gestantes

No período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005 foram feitas as coletas das amostras de secreção do endocérvice das mulheres grávidas que frequentaram o ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário D. Francisca Mendes, na cidade de Manaus, estado do Amazonas.

A amostragem compreendeu ao estrato da população de gestantes (último trimestre) atendidas no ambulatório e alocadas segundo os critérios de inclusão ou exclusão do estudo.

Para serem incluídas no estudo, as participantes tiveram que satisfazer as seguintes condições:

- Estar grávida no terceiro trimestre (29 a 41 semanas e seis dias de idade gestacional), sendo a idade gestacional dada pela data da última menstruação e ou ultra-sonografia.
- Frequentar o ambulatório de pré-natal de baixo risco no Hospital Universitário D. Francisca Mendes.
- Ter residência em Manaus há pelo menos 1 ano.
- Concordar em participar da investigação e assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (TCLE), após tomar conhecimento dos objetivos e da metodologia do estudo.

Como critérios de exclusão foram utilizados os que não satisfizeram a inclusão ou apresentavam uma ou mais das situações abaixo relacionadas:

- Mulheres com duração da gestação menor do que 28 semanas e 6 dias.
- Gestantes em uso de antibiótico devido à outra infecção diagnosticada ou com história de uso nos últimos 30 dias.
- Gestantes que tiveram relação sexual nas últimas 72 horas.
- Gestantes em uso de cremes vaginais.
- Gestantes com sangramento vaginal.
- Gestantes com diagnóstico de placenta prévia.
- Gestantes com diagnóstico ou suspeita clínica de ruptura prematura de membranas.

As mães que participaram da primeira fase do estudo foram mantidas em contato telefônico de modo que a pesquisadora tivesse conhecimento do momento da internação na maternidade para dar início a segunda fase do estudo onde 88 gestantes foram avaliadas no parto e durante o período puerperal. Doze foram excluídas da amostra: quatro por perda de contato e oito por tempo insuficiente de acompanhamento (menos de quarenta dias pós-parto).

4.2.3.2 Recém-nascidos

Ao tomar conhecimento da internação da paciente na maternidade e conseqüentemente do nascimento do recém-nascido, a pesquisadora dava início ao acompanhamento da criança.

Oitenta e sete recém-nascidos foram avaliados nas primeiras vinte quatro horas de vida e acompanhados a cada quinze dias até sessenta dias de vida.

Foram excluídos da amostra doze recém-nascidos: quatro devido à perda de contato e oito por tempo insuficiente de acompanhamento (menos de sessenta dias de vida). Um recém-nascido foi natimorto.

4.3 PROCEDIMENTOS

As participantes foram abordadas individualmente na sala de espera do ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário D. Francisca Mendes e esclarecidas sobre os objetivos do estudo, riscos associados ao estudo, benefícios, confidencialidade dos registros.

A participante que aceitou, assinou o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (anexo 1) e em seguida foi aplicado um questionário padronizado (anexo 2) onde foram avaliados os seguintes dados: idade, escolaridade, estado marital, renda familiar, história ginecológica e obstétrica, número de parceiros sexuais.

As gestantes que aceitaram participar do estudo foram mantidas em contato telefônico de modo que a pesquisadora tomasse conhecimento do momento de sua internação na maternidade ou do nascimento do recém-nascido para iniciar a outra fase do estudo.

Vale ressaltar que o presente trabalho foi aprovado, em 18 de Dezembro de 2003, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, conforme Resolução do CONCEP nº. 196 de 10 de Outubro de 1996 (anexo 3).

4.3.1 Obtenção das Amostras

Com auxílio de um espécúlo vaginal e com as escovas cito-brush (figura 2) foram feitas as coletas das amostras de secreção do endocérvice nas gestantes que aceitaram participar do estudo. Estas amostras foram colocadas em um frasco contendo 400 µL de tampão (TE) e mantidas no gelo até o momento do transporte ao laboratório onde foram congeladas a -20°C até o momento da extração.

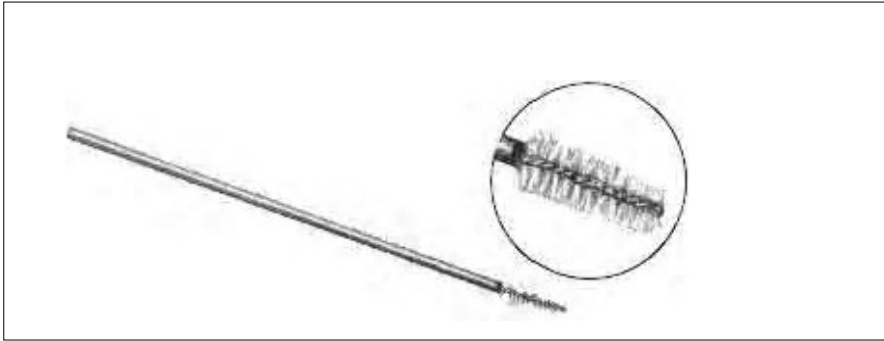


Figura 2 - Escova Cito-brush utilizada para coleta de material endocervical.

FONTE: <http://www.kolplast.com.br>

4.3.2 Acompanhamento dos Recém-nascidos

Ao tomar conhecimento da internação da gestante ou do nascimento do recém-nascido na maternidade, planejava a primeira visita de avaliação e acompanhamento dos mesmos nas primeiras vinte quatro horas de vida, sendo programada as avaliações subseqüentes a cada quinze dias, as quais foram realizadas através de ligações telefônicas, até sessenta dias de vida.

Caso houvesse alguma queixa em relação ao aparecimento de secreção ocular e ou sintomas respiratórios, uma consulta era agendada com a criança para avaliação clínica, a qual era realizada em seu domicílio ou no ambulatório do Hospital Universitário D. Francisca Mendes.

Os sintomas respiratórios foram, inicialmente, relatados pela mãe e observados pelo pesquisador após avaliação clínica e exame físico do paciente e referidos como o surgimento de sinais não fisiológicos persistentes nas vias aéreas superiores ou inferiores, tais como: obstrução nasal, rinorréia aquosa ou não, tosse, ausculta pulmonar com roncosp ou estertorações. Caso houvesse necessidade era realizada uma radiografia de tórax.

As anotações sobre as queixas e avaliação clínica e exame físico do lactente eram feitas no verso do questionário da paciente e registradas em um banco de dados do programa Epi-Info (versão 3.3 for Windows).

4.3.3 Método Diagnóstico

O método diagnóstico utilizado para detecção da *Chlamydia trachomatis* no material coletado do endocérvice das gestantes foi a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que

consiste em um processo cíclico no qual se produz grande quantidade de ácidos nucleicos a partir de pequenas quantidades de material.

4.3.3.1 Extração do DNA

Aos 400 µL de tampão TE (tris HCl 10mM;EDTA 1mM) utilizados na coleta do material foram adicionados 400 µL de TPK (900 µL de TE + 100 µL de Tween 20 a 10% + 20 µL de proteinase K 10mg/ml). A seguir esta mistura foi levada ao banho-maria a 55°C por uma hora e depois fervida por dez minutos (BAUER & MANOS, 1998).

As amostras que continham sangue foram submetidas a extração com fenol:clorofórmio descrita a seguir (SAMBROOK *et al.*, 1989).

Pegamos 400 µL da amostra previamente digerida com proteinase K 10mg/ml e adicionamos 400 µL de fenol, homogeneizamos por 10 minutos seguidos de 10 minutos de centrifugação a 12000 g. Em seguida coletamos o sobrenadante e adicionamos 400 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizamos por 10 minutos e a seguir centrifugamos a 12.000g por 10 minutos. Coletamos o sobrenadante e adicionamos 400 µL de clorofórmio hidratado, agitamos suavemente por 10 minutos seguidos de centrifugação a 12.000g por 10 minutos. Novamente coletamos o sobrenadante (350 µL) e adicionamos 1/10V do volume de NaCl 5M, ou seja, 35 µL NaCl 5M + 1.000 µL de etanol absoluto). Homogenizamos bem e deixamos precipitando à 0°C por 12 horas.

Continuando o procedimento de extração, centrifugamos a 12.000g por 20 minutos, descartamos o sobrenadante e a seguir lavamos o sedimento de DNA com 500 µL de etanol a 70% gelado. Centrifugamos novamente à 14.000g por 10 minutos e descartamos o sobrenadante com cuidado para não perder o DNA. Deixamos secar e ressuspendemos em 40 µL de Tampão de ressuspensão Tris HCl 2mM (TR).

4.3.3.2 PCR Controle da Integridade do DNA

Para certificar a integridade do DNA da amostra, a mesma foi submetida a reação de amplificação utilizando-se os *primers* ISO05 descritos por Pontes (2003) que amplificam uma região de microsatélite (GATA)₁₃ do cromossomo 15 humano.

4.3.3.2.1 Sistema da reação da PCR controle da integridade do DNA

O sistema de reação foi composto de 2,2 µL de H₂O Milli-Q; 2,5 µL de Tampão 10x (500 mM KCl e 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)); 2,5 µL de MgCl₂ 20 mM; 2,5 µL do pool de dNTP (200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfato) 2,5 mM; 5,0 µL do par de *primers* ISO05 (5 pmol); 0,3 µL da enzima *Taq* DNA polimerase 5U/ µL e 5,0 µL da solução contendo a amostra de DNA, totalizando um volume final de 20,0 µL.

As reações de PCR foram realizadas em aparelho termociclador PXE 0.2 Thermal Cycler – Electron Corporation, programada para realizar o seguinte ciclo:

- 2 minutos à 95°C (Pré-aquecimento)
 - 1 minuto à 95°C para desnaturação
 - 1 minuto à 55°C para anelamento
 - 1 minuto à 72°C para alongação
 - 5 minutos à 72°C para alongação final
- } 40 ciclos

O aparelho foi programado para que ao término dos ciclos conserve as amostras a 4°C até que sejam retiradas e refrigeradas.

4.3.3.2.2 Eletroforese em Gel de Agarose 2,5%

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2,5% (p/v) em tampão 1x. Foi iniciada a corrida com 70 volts até a entrada da amostra no gel quando então foi aumentada a voltagem para 110 volts até o final da corrida com duração de duas horas. Utilizou-se como marcador, o “ladder” múltiplo de 100 pb da Invitrogen. O gel foi corado com brometo de etídeo por 20-30 minutos e fotografado na máquina da Pharmacia Biotech, ImageMaster^R VDS FTI-500.

4.3.3.3 Amplificação do DNA (PCR) para Diagnóstico da *Chlamydia trachomatis*

Para amplificação do DNA da *Chlamydia trachomatis* utilizou-se os *primers* denominados KL1 e KL2 que amplificam um fragmento de 241 pb do plasmídeo, sendo suas seqüências apresentadas a seguir (MAHONY *et al*, 1993):

OLIGONUCLEOTÍDEOS	SEQUÊNCIA 5' →3'
KL1	TCCGGAGCGAGTTACGAAGA
KL2	AATCAATGCCCGGGATTGGT

O sistema de reação de amplificação do DNA da *Chlamydia trachomatis* foi composto de 5,0 µL de Tampão 10x; 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM; 1µL de dNTP 10,0 mM; 5 µL do *primer* KL1 5 pmol; 5 µL do *primer* KL2 5 pmol; 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL; 5 µL da amostra e 27,0 µL de água Milli-Q para completar o volume de 50 µL.

A amplificação de DNA foi processada em um aparelho termociclador PXE 0.2 Thermal Cycler – Electron Corporation, programada para realizar o seguinte termociclo:

- Hot start 94°C por 2min
 - Desnaturação 94°C por 1min
 - Anelamento 64°C por 1min
 - Síntese 72°C por 2min
- } 35 ciclos

No final, deixou-se mais uma temperatura de síntese a 72°C por 5 minutos.

O aparelho foi programado para que, ao término dos ciclos, as amostras sejam mantidas a 4°C até que sejam retiradas e refrigeradas.

4.3.3.3.1 Eletroforese em Gel de Agarose 2%

Os fragmentos amplificados foram analisados em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão 1x. Iniciou-se a corrida com 70 volts até a entrada da amostra no gel quando então foi aumentada a voltagem para 110 volts até o final da corrida com duração de duas horas. Utilizou-se como marcador, o “ladder” múltiplo de 100 pb da Invitrogen. O gel foi corado com brometo de etídeo por 20-30 minutos e fotografado na máquina da Pharmacia Biotech, ImageMaster^R VDS FTI-500.

4.3.3.4 Seqüenciamento dos Produtos da PCR

Os produtos amplificados da reação de PCR foram seqüenciados utilizando-se os *primers* KL1 ou KL2, no seqüenciador automático “MegaBACE 1000 (Amersham Biociences)” que tem eficiência de resolução de aproximadamente 700 pares de bases, sendo que o amplicon tinha apenas 241 pares de bases.

Para o sequenciamento, utilizou-se o seguinte sistema de reação: 20 ng do DNA; 5,0 µL do “pré – mix DYEnamic ET – terminator Kit”; 3,0 µL do *primer* KL1 ou KL2 5 pmol/µL, e água para completar o volume final de 10 µL. A reação preparada foi levada ao aparelho termociclador PXE 0.2 Thermal Cycler – Electron Corporation, e submetida ao seguinte programa: 95°C por 25 segundos; (95°C por 15 segundos; 50°C por 20 segundos; 60°C por 1 minuto) repetidos por 30 ciclos de amplificação.

4.3.3.4.1 Precipitação do produto da reação de sequenciamento

Ao produto da reação de sequenciamento foi adicionado 1 µL de acetato de amônia 7,5 M e 27,5 µL de etanol absoluto. Este sistema foi misturado utilizando-se o agitador por alguns segundos e incubado por vinte minutos à temperatura ambiente. A placa foi envolvida em alumínio laminado para evitar a incidência de luz.

Seguindo-se a etapa de incubação a placa foi centrifugada a 4.000 rpm por quarenta minutos, a 4°C em centrífuga refrigerada “Eppendorf 5804R”. O sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 120 µL de etanol 70% gelado e a placa centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante descartado. A placa foi centrifugada invertida tendo o cuidado de não ultrapassar 700 rpm por alguns segundos. Deixou-se secar a placa no fluxo laminar e em seguida o DNA foi ressuspense em 10 µL de tampão de carregamento (formamida a 70% e EDTA 1 mM). A placa foi vedada e agitada vigorosamente em vortex por dois minutos. Foi realizada mais uma centrifugação a 1.000 rpm por apenas alguns segundos.

Em seguida as amostras foram submetidas ao sequenciador automático “MegaBACE 1000 (Amersham Biociences)”. O método original de sequenciamento foi descrito por Sanger *et al.* (1977).

A análise da seqüência nucleotídica do fragmento amplificado foi realizada em sequenciador automático “MegaBACE 1000 (Amersham Biociences)” através de eletroforese capilar em gel de poliacrilamida. Para injeção utilizou-se 3 KV por 80 segundos; e a corrida processou-se a 6 KV por 200 minutos, sob uma temperatura de 44 °C.

4.3.3.4.2 Análise das seqüências nucleotídicas

Para confirmação e identificação do DNA da *Chlamydia*, foram realizadas comparações de todas as seqüências nucleotídicas das amostras seqüenciadas, com as seqüências depositadas no Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos – GeneBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se o programa BLAST/BLAST N (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A amostra inicial utilizada na análise foi composta por 100 gestantes no terceiro trimestre, atendidas no Hospital Universitário Dona Francisca Mendes para estimar a prevalência de *Chlamydia trachomatis* na população estudada.

Na segunda fase do estudo, foram acompanhadas 88 gestantes durante o período puerperal (quarenta dias) e 87 recém-nascidos do nascimento aos sessenta dias de vida.

Os dados estão apresentados em tabelas e gráficos onde se calculou as frequências absolutas simples e relativas para os dados qualitativos e médias, mediana e desvio-padrão (DP) para os dados quantitativos.

Para avaliar a associação entre as variáveis categóricas utilizou-se a Estatística de Teste do Qui-quadrado de *Pearson*. Na impossibilidade da aplicação do teste de *Pearson* utilizou-se o teste com correção de *Yates*, e na impossibilidade deste o teste exato de *Fisher*. Na análise dos fatores de risco para os recém-nascidos calculou-se o risco relativo (RR).

Na análise de comparação das médias, utilizou-se o teste T de Student pois os dados encontravam-se normalmente distribuídos, e para estimar a prevalência de *Chlamydia* nas gestantes o Intervalo de Confiança ao nível de 95%.

O software utilizado na análise foi o programa Epi-Info 3.3 for Windows desenvolvido e distribuído pelo CDC e o nível de significância utilizado nos testes foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 PRIMEIRA FASE – ESTUDO DE PREVALÊNCIA

Entre as 100 gestantes que participaram do estudo, 11 apresentaram amplificação do fragmento de 241 pb utilizando-se os *primers* KL1 e KL2 que amplificam o DNA plasmidial da *Chlamydia trachomatis* na secreção do endocérvice, nos dando uma prevalência de 11% (Gráfico 1).

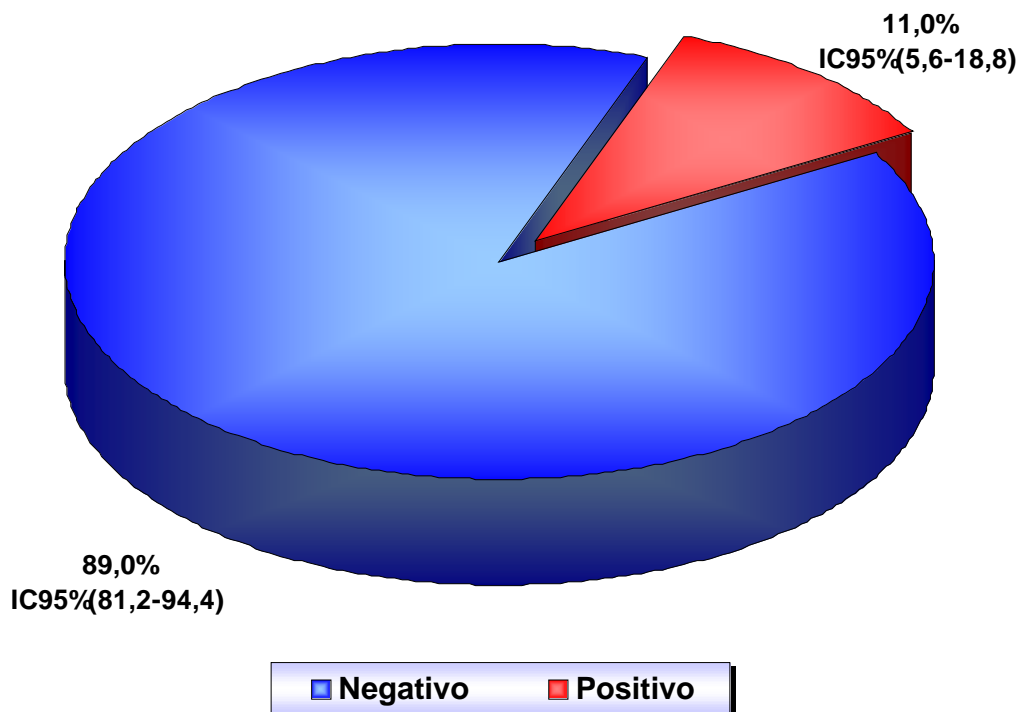


Gráfico 1- Distribuição segundo o resultado da *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Julho de 2005, na cidade de Manaus - AM.

5.1.1 PCR Controle da Integridade do DNA

A figura 3 mostra o resultado da PCR para controle do DNA, cujo sistema de reação já foi descrito na seção 4.3.3.2 e analisados em gel agarose 2,5%.

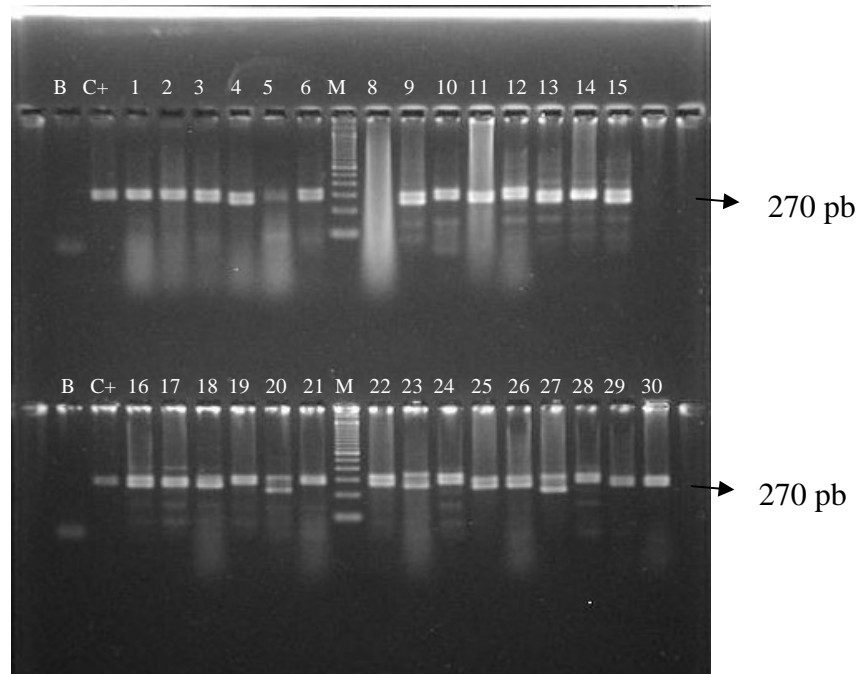


Figura 3 - Foto de um gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio, evidenciando um fragmento em torno de 270 pb resultante da amplificação da região de microsatélite (GATA)₁₃ do cromossomo 15 humano, utilizando os *primers* ISO05 *forward* e *reverse* (PONTES, 2003); M: marcador de 100 pb INVITROGEN Life Technologies; B: branco; C+: controle positivo; 1-30: amostras das pacientes gestantes no terceiro trimestre da gravidez.

5.1.2 Amplificação do DNA (PCR) para Diagnóstico da *Chlamydia trachomatis*

Certificados da integridade do DNA da amostra, procedeu-se então a PCR para diagnóstico da *Chlamydia trachomatis* conforme descrito na seção 4.3.3.3. Os fragmentos amplificados foram então analisados em gel de agarose a 2% (Figura 4).

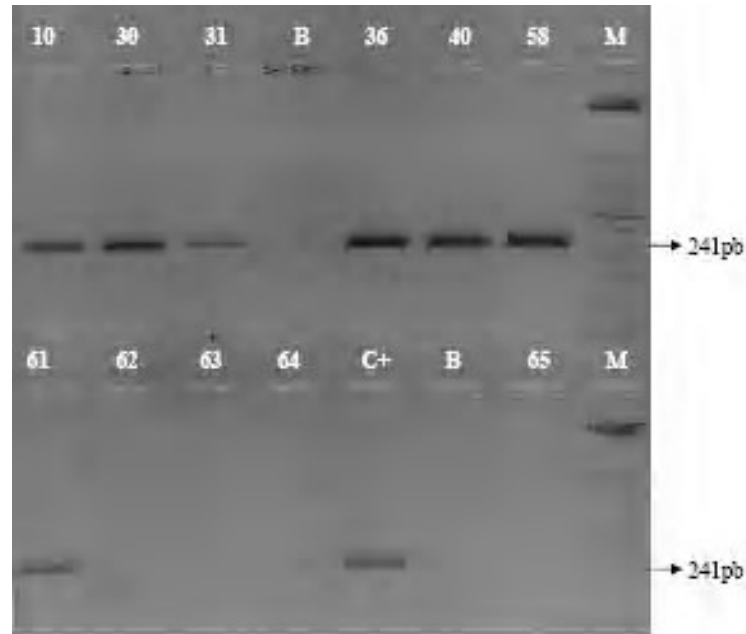


Figura 4 - Foto de um gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídio, evidenciando um fragmento de 241 pb resultante da amplificação do DNA plasmidial da *Chlamydia trachomatis*, utilizando-se os *primers* KL1 e KL2 (MAHONY *et al.*, 1993); M: marcador de peso molecular de 50 pb INVITROGEN Life Technologies; B: branco; C+: controle positivo; 10,30,31,36,40,58,61-65: amostras de pacientes gestantes no terceiro trimestre da gravidez.

5.1.3 Sequenciamento dos Produtos da PCR

O quadro 3 mostra a análise das seqüências de cinco dos produtos amplificados após o sequenciamento no *MegaBACE* 1000 (Amersham Biociences) e análise no Banco de Dados Mundial de Seqüências de Nucleotídeos – GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando-se o programa BLAST/BLAST N (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Após análise das seqüências no GeneBank, as amostras mostraram homologia com as seqüências de plasmídeos depositadas sob o GI: 40730.

	365	375	385	395	405	415
Plasm	TTGACCGATG	TACTCTTGTA	GAAAGTGCAT	AAACTTCTGA	GGATAAGTTA	TAATAATCCT
Amostra 10	-----	-----	-----	-----	-----TA	TAATAATCCT
Amostra 30	-----	-----	-----	-----	-----TTA	TAATAATCCT
Amostra 31	-----	-----	-----AT	AAACTTCTGA	GGATAAGTTA	TAATTATCCT
Amostra 40	-----	-----	----GTGCAT	AAACTTCTGA	GGATAAGTTA	TAATAATCCT
Amostra 58	-----	-----	-----	-----	----AGTTA	TAATAATCCT

	425	435	445	455	465	475
Plasm	CTTTTCTGTC	TGACGGTTCT	TAAGCTGGGA	GAAAGAAATG	GTAGCTTGTT	GGAAACAAAT
Amostra 10	CTTTTCTGTC	TGACGGTTCT	TAAGCTGGGA	GAAAGAAATG	GTAGCTTGTT	GGAAACAAAT
Amostra 30	CTTTTCTGTC	TGACGGTTCT	TAAGCTGGGA	GAAAGAAATG	GTAGCTTGTT	GGAAACAAAT
Amostra 31	CTTTTCTGTC	TGACGGTTCT	TAAGCTGGGA	GAAAGAAATG	GTAGCTTGTT	GGAAACAAAT
Amostra 40	CTTTTCTGTC	TGACGGTTCT	TAAGCTGGGA	GAAAGAAATG	GTAGCTTGTT	GGAAACAAAT
Amostra 58	CTTTTCTGTC	TGACGGTTCT	TAAGCTGGGA	GAAAGAAATG	GTAGCTTGTT	GGAAACAAAT

	485	495	505	515	525	535
Plasm	CTGACTAATC	TCC AAGCTT A	AGACTTCAGA	GGAGCGTTTA	CCTCCTTGGA	GCATTGTCTG
Amostra 10	CTGACTAATC	TCC AAGCTT A	AGACTTCAGA	GGAGCGTTTA	CCTCCTTGGA	GCATTGTCTG
Amostra 30	CTGACTAATC	TCC AAGCTT A	AGACTTCAGA	GGAGCGTTTA	CCTCCTTGGA	GCATTGTCTG
Amostra 31	CTGACTAATC	TCC AAGCTT A	AGACTTCAGA	GGAGCGTTTA	CCTCC-----	-----
Amostra 40	CTGACTAATC	TCC AAGCTT A	AGACTTCAGA	GGAGCGTTTA	CCTCCTTGGA	GCATTGTCTG
Amostra 58	CTGACTAATC	TCC AAGCTT A	AGACTTCAGA	GGAGCGTTTA	CCTCCTTGGA	GCATTGTCTG

	545	555	565	575	585	595
Plasm	GGCGATCAAC	CAATCCC	CATTGATTTT	TTTTAGCTCT	TTTAGGAAGG	ACGCTGTTTG
Amostra 10	GGCGATCAAC	CAATCCC	CA-----	-----	-----	-----
Amostra 30	GGCGATCAAC	CAATCCC	CATTGAT---	-----	-----	-----
Amostra 31	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Amostra 40	GGCGATCAAC	CAATCCC	CATTGAT---	-----	-----	-----
Amostra 58	GGCGATCAAC	CAATCCC	CATT-----	-----	-----	-----

Quadro 3 – Comparação dos produtos da PCR das amostras 10, 30, 31, 40, 58 com a seqüência do plasmídeo de *Chlamydia trachomatis*. **AAGCTT** – sítio de *Hind* III; ---- não se obteve a seqüência; 10, 30, 31, 40, 58 – amostras seqüenciadas; Plasm – seqüência do plasmídeo. Análise realizada no Banco de Dados Mundial de Nucleotídeos – GeneBank, utilizando-se o programa BLAST/BLAST N (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

5.1.4 Características da População

Os dados sócio-demográficos das participantes do estudo são apresentados na tabela 1. A média de idade das pacientes foi de 25,9 anos (\pm 5,4), a maioria (89/100) referia ter união estável (89%) e 46% (46/100) referiram ter completado o ensino médio. A renda familiar da maioria das pacientes (56/100 - 56%) era de dois a quatro salários mínimos. Noventa e sete por cento (97/100) referiram ter um único parceiro no último ano.

Quanto à zona de residência das pacientes estudadas, 57% residem na zona norte, 36% na zona leste, 3% na zona oeste, 2% na zona sul da cidade de Manaus.

Variáveis	N	%
Idade (anos)		
< 25	44	44,0
25 --- 30	35	35,0
> 30	21	21,0
Média (DP)	25,9 (5,4)	
Mediana	26,0	
Estado Marital		
Solteira	11	11,0
União estável	89	89,0
Escolaridade		
Fundamental incompleto	19	19,0
Fundamental completo	15	15,0
Médio incompleto	14	14,0
Médio completo	46	46,0
Superior incompleto	4	4,0
Superior completo	2	2,0
Renda familiar (salário mínimo)		
Um	35	35,0
Dois a quatro	56	56,0
Cinco a seis	7	7,0
Mais de seis	2	2,0
Número de parceiros no último ano		
Um	97	97
Dois	3	3,0

Tabela 1 - Distribuição segundo os dados sócio-demográficos das gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus - AM.

FONTE: Questionário realizado com gestantes que participaram do estudo.

Na população estudada a média de gestações foi de 2,6 ($\pm 1,8$), sendo a média de paridade de 1,2 ($\pm 1,5$) conforme podemos observar nas tabelas 2 e 3.

Número de gestações	n	%	Cum.(%)
Uma	30	30,0	30,0
Duas a três	45	45,0	75,0
Quatro a cinco	22	22,0	97,0
Mais de cinco	3	3,0	100,0
Total	100	100,0	-

Média: 2,6; **DP:** 1,8; **Mediana:** 2

Tabela 2 - Distribuição segundo o número de gestações anteriores nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus - AM.

FONTE: Questionário realizado com gestantes que participaram do estudo

Número de paridades	N	%
Nenhuma	40	40,0
Uma	25	25,0
Duas a três	31	31,0
Quatro a cinco	2	2,0
Mais de cinco	2	2,0
Total	100	100,0

Média: 1,2; **DP:** 1,5; **Mediana:** 1

Tabela 3 - Distribuição segundo número de paridade das gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus - AM.

FONTE: Questionário realizado com gestantes que participaram do estudo.

Quanto ao número de abortos, 67% das gestantes não tinham ou negaram história anterior, sendo que 25% referiram ter tido um, 6% dois e 2% três abortos anteriores à gestação atual. Segundo o tipo de aborto 81,8% referiram ter tido aborto espontâneo e 18,2% aborto provocado (Gráfico 2).

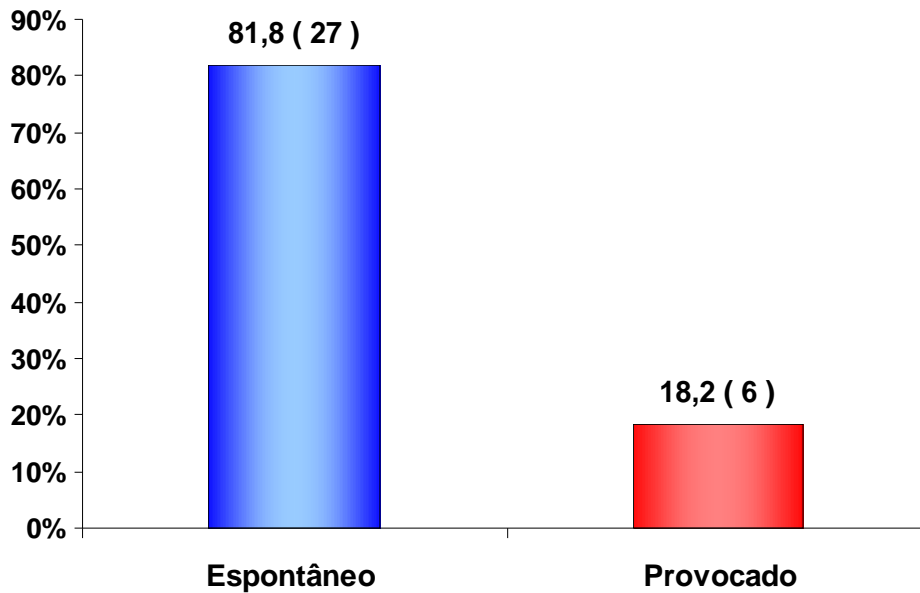


Gráfico 2 - Distribuição segundo o tipo de aborto das gestantes no terceiro trimestre atendidas no pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus – AM.

FONTE: Questionário realizado com gestantes que participaram do estudo.

Quando as pacientes foram questionadas sobre a história anterior de doenças sexualmente transmissíveis, 4% referiram ter sido tratadas para condilomatose vulvar, 3% já haviam recebido tratamento para sífilis e 2% referiram ter herpes genital (Tabela 4).

Doenças anteriores (n=100)	n	%
Condilomatose vulvar	4	4,0
Sífilis	3	3,0
Herpes	2	2,0

Tabela 4 - Distribuição segundo o histórico das doenças sexualmente transmissíveis anteriores à gestação atual nas gestantes atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus - AM.

FONTE: Questionário realizado com gestantes que participaram do estudo.

Quanto ao exame de VDRL realizado rotineiramente na gestação, 2% das pacientes tinham resultado positivo com titulação de $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$, 90% eram não reativas e 8% não tinham resultado do exame até o dia do preenchimento do questionário (Tabela 5).

VDRL (n=100)	n	%
Reativo	2	2,0
Não reativo	90	90,0
Não realizado	8	8,0

Tabela 5 - Distribuição segundo o exame de VDRL para diagnóstico da sífilis realizado durante a gestação atual nas gestantes no terceiro trimestre, atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus - AM.

FONTE: Questionário realizado com gestantes que participaram do estudo.

Na avaliação clínica das gestantes, durante o exame especular, no momento da coleta do material do endocérvice, foi observado que 100% tinham secreção vaginal sendo as características descritas na tabela 6.

Exame especular (n=100)	n	%
Colo sangrante	12	12,0
Cervicite	11	11,0
Secreção endocervical	32	32,0
Cor da secreção vaginal		
Amarelado	36	36,0
Branco	61	61,0
Sanguinolento	3	3,0
Odor da secreção vaginal		
Fétido	4	4,0
Inodoro	96	96,0

Tabela 6 – Distribuição segundo a descrição do exame especular das gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus - AM.

Quando analisamos os dados sócio-demográficos em relação ao resultado da *Chlamydia trachomatis* nas gestantes que participaram do estudo não observamos significância estatística entre as mães positivas e negativas (p-valor > 0,05) conforme mostra a tabela 7.

Variáveis	PCR para <i>Chlamydia</i>				p-valor
	Positivo (n = 11)		Negativo (n = 89)		
	n	%	n	%	
Idade (anos)					*
< 25	8	72,7	36	40,4	
25 --- 30	2	18,2	33	37,1	
> 30	1	9,1	20	22,5	
Média (DP)	23,5 (4,5)		26,2 (5,5)		0,1319**
Mediana	21		26		
Estado Marital					0,7670
Solteira	2	18,2	9	10,1	
União estável	9	81,8	80	89,9	
Escolaridade					*
Fundamental incompleto	1	9,1	18	20,2	
Fundamental completo	2	18,2	13	14,6	
Médio incompleto	2	18,2	12	13,5	
Médio completo	5	45,5	41	46,1	
Superior incompleto	1	9,1	3	3,4	
Superior completo	-	-	2	2,2	
Renda familiar					*
Um	5	45,5	30	33,7	
Dois a quatro	5	45,5	51	57,3	
Cinco a seis	1	9,1	6	6,7	
Mais de seis	-	-	2	2,2	
N. de parceiros no último ano					0,7501
Um	10	90,9	87	97,8	
Dois	1	9,1	2	2,2	

* Não foi possível aplicar a estatística de teste, nos demais se utilizou o qui-quadrado com correção de Yates.

** Teste T de Student.

Tabela 7 - Distribuição segundo os dados sócio-demográficos em relação ao resultado da PCR para *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período entre 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus - AM.

Em relação à zona urbana onde residem as pacientes que participaram do estudo observamos uma maior distribuição na zona leste e norte da cidade, sendo que 7 entre as 11 (63,6%) gestantes com PCR positiva para *Chlamydia*, são residentes na zona leste da cidade (tabela 8).

Zona	PCR para <i>Chlamydia</i>				Total
	Positivo		Negativo		
	n	%	N	%	
Norte	3	27,3	54	60,7	57
Leste	7	63,6	29	32,6	36
Centro Oeste	1	9,1	2	2,2	3
Oeste	-	-	2	2,2	2
Sul	-	-	2	2,2	2
Total	11	11,0	89	89,0	100

Tabela 8 - Distribuição segundo a zona urbana de residência das gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM, em relação ao resultado da PCR para *Chlamydia trachomatis*.

FONTE: Questionário realizado com gestantes que participaram do estudo.

Quanto ao histórico do número e tipo de aborto nas gestantes estudadas em relação ao resultado da PCR para *Chlamydia trachomatis*, não houve diferença estatisticamente significativa (p-valor > 0,05), como mostra as tabelas 9 e 10.

Variável	PCR para <i>Chlamydia</i>				p-valor
	Positivo		Negativo		
	Média	DP	Média	DP	
Número de abortos	0,4	0,7	0,4	0,7	0,7408

Tabela 9 - Distribuição segundo o número de aborto em relação ao resultado da PCR para *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus-AM.

Tipo de aborto	PCR para <i>Chlamydia</i>				Total
	Positivo		Negativo		
	n	%	n	%	
Espontâneo	2	66,7	25	83,3	27
Provocado	1	33,3	5	16,7	6
Total	3	9,1	30	90,9	33

$$\chi^2_{Yates} = 0,01; \text{ p-valor} = 0,9431$$

Tabela 10 - Distribuição segundo o histórico do tipo de aborto em relação ao resultado da *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus – AM.

A avaliação clínica realizada durante o exame especular para a coleta de secreção do endocérvice quando relacionado à positividade para *Chlamydia trachomatis* mostrou ter associação estatisticamente significativa ao nível de 5% em relação aos sinais de cervicite e com a presença de secreção endocervical, mas não mostrou significância estatística com as características da secreção vaginal (p-valor > 0,05), conforme mostra a tabela 11.

Exame especular	<i>Chlamydia</i>				Total
	Positivo (n = 11)		Negativo (n = 89)		
	n	%	n	%	
Colo sangrante					0,8595
Sim	1	9,1	11	12,4	
Não	10	90,9	78	87,6	
Cervicite					0,0193
Sim	4	36,4	7	7,9	
Não	7	63,6	82	92,1	
Secreção endocervical					0,0411
Sim	7	63,6	25	28,1	
Não	4	36,4	64	71,9	
Cor da secreção vaginal					*
Amarelado	8	72,7	28	31,5	
Branco	3	27,3	58	65,2	
Sanguinolento	-	-	3	3,4	
Odor da secreção vaginal					0,0838
Fétido	2	18,2	2	2,2	
Inodoro	9	81,8	87	97,8	

* Não foi possível aplicar a estatística de teste, nos demais se utilizou o qui-quadrado com correção de Yates.

Tabela 11 - Distribuição segundo a descrição do exame especular em relação ao resultado da PCR para *Chlamydia trachomatis* nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, na cidade de Manaus – AM.

5.2 SEGUNDA FASE:

5.2.1 Dados Maternos e Perinatais

Oitenta e oito gestantes foram avaliadas no momento de sua internação na maternidade. Foram analisados dados referentes ao parto como a ruptura prematura de membranas, baixo peso ao nascer e prematuridade. As mães foram acompanhadas durante o período puerperal (quarenta dias).

Com relação à ruptura prematura de membranas não houve significância estatística entre as mães com teste positivo ou negativo, p-valor > 0,05 (tabela 12).

Bolsa rota	PCR para <i>Chlamydia trachomatis</i>				Total
	Positivo		Negativo		
	N	%	N	%	
Sim	4	36,4	32	41,6	36
Não	7	63,6	45	58,4	52
Total	11	12,5	77	87,5	88

$$\chi^2_{Yates} = 0,06; p\text{-valor} = 0,9998$$

Tabela 12 - Distribuição segundo a ruptura prematura de membrana amniótica em relação a PCR positiva para *Chlamydia trachomatis*, em Manaus-AM, 2005.

Não houve ocorrência de prematuridade na população estudada. A idade gestacional avaliada pelo capurro somático (avaliação feita pelo neonatologista pelas características físicas da criança) no recém-nascido teve uma média de 39,4 ($\pm 0,7$) semanas (tabela 13).

Exposição a <i>Chlamydia</i>	Idade Gestacional (Capurro Somático)				
	Média	DP	Mediana	Mín.	Máx.
SIM	39,4	0,7	39,5	38	40
NÃO	39,3	1,1	39,0	36	42

$$p\text{-valor} = 0,8473$$

Tabela 13. Distribuição segundo a média do capurro somático dos recém-nascidos atendidos em oito maternidades públicas ou conveniadas com o sistema SUS, em relação a infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus-AM, 2005.

Através do teste T de Student podemos observar que não existe diferença entre o Capurro somático e o resultado da *Chlamydia* ao nível de 5%.

Quanto ao peso de nascimento, também não foi observada incidência de baixo peso ao nascer, caracterizado como peso de nascimento menor que 2500 grs, em relação à infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, como podemos observar na tabela 14.

Peso	Exposição a <i>Chlamydia</i>				Total
	SIM		NÃO		
	n	%	N	%	
< 2500	-	-	2	2,6	2
2500 --- 3000	1	10,0	16	20,8	17
3000 --- 4000	8	80,0	55	71,4	63
≥ 4000	1	10,0	4	5,2	5
Total	10	11,5	77	88,5	87

Tabela 14 - Distribuição segundo o peso de nascimento dos recém-nascidos expostos e não expostos a *Chlamydia trachomatis*, em Manaus-AM, 2005.

Não é possível aplicar a estatística de teste do qui-quadrado, pois existem na tabela mais de 20% valores esperados inferiores a cinco unidades.

Uma gestante primípara sem histórico anterior de cirurgias abdominais, não entrou em trabalho de parto sendo indicado parto cesariana por pós-maturidade. Na descrição cirúrgica feita pelo obstetra havia relato de aderências pélvicas e fator tubário.

Uma puérpera foi re-internada após uma semana com diagnóstico clínico de endometrite pós-parto.

Nos dois casos descritos acima as mães tinham PCR positivo para *Chlamydia trachomatis*.

Uma gestante, também com PCR positivo para *Chlamydia trachomatis*, deu a luz a um feto natimorto com 34 semanas de idade gestacional e evoluiu com infecção pós-parto (endometrite).

5.2.2 Coorte dos Recém-nascidos

Foram acompanhadas 87 crianças do nascimento até sessenta dias de vida, filhos de pacientes que participaram da primeira fase do estudo. Um recém-nascido foi natimorto e doze foram excluídos da amostra: quatro por perda de contato e oito por tempo insuficiente para acompanhamento (menos de sessenta dias de vida).

Observamos que 16 entre as 87 crianças (18,4%) apresentaram sintomas respiratórios como podemos observar no Gráfico 3.

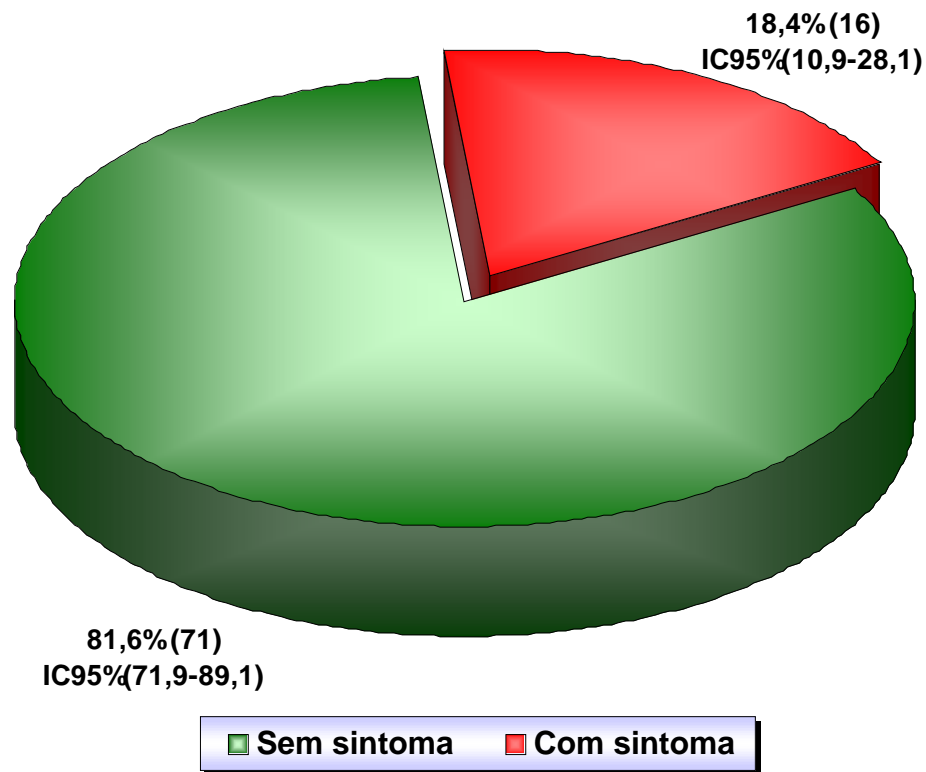


Gráfico 3 - Distribuição segundo o aparecimento de sintomas respiratórios em um coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, expostas e não expostas a infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus – AM, 2005.

Na avaliação das crianças expostas e não expostas à infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, observamos, no presente trabalho, que as crianças expostas têm 7,7 vezes mais chance de desenvolver sintomas respiratórios nos primeiros sessenta dias de vida (tabela 15).

Exposição a <i>Chlamydia</i>	Sintomas Respiratórios				Total
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
SIM	8	50,0	2	2,8	10
NÃO	8	50,0	69	97,2	77
Total	16	18,4	71	81,6	87

RR = 7,7; IC95% (3,7 – 15,9)

Tabela 15 - Incidência de sintomas respiratórios no coorte de oitenta e sete recém-nascidos expostos e não expostos a infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus-AM, 2005.

Dentre os recém-nascidos, apenas cinco (5/87 - 5,7%) tiveram relato de conjuntivite, sendo três (3/10 - 30,0%) filhos de mães portadoras de *Chlamydia trachomatis*. Dois (2/87 - 2,3%) recém-nascidos apresentaram desconforto respiratório logo após o nascimento, sendo um deles (1/10 - 10,0%) filho de mãe com teste positivo para *Chlamydia trachomatis*.

Um (1/87 - 1,1%) recém-nascido evoluiu com infecção neonatal precoce, sendo este, filho de mãe com resultado negativo para *C. trachomatis*.

Quando analisamos o aparecimento de sintomas respiratórios com o tipo de parto observamos que não houve diferença estatisticamente significativa (p-valor = 0,8312) entre parto vaginal ou cesariano (tabela 16).

Tipo de parto	Sintomas respiratórios				Total
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Cesariano	7	43,8	29	40,8	36
Vaginal	9	56,2	42	59,2	51
Total	16	18,4	71	81,6	87

$$\chi^2 = 0,04; \text{ p-valor} = 0,8312$$

Tabela 16 - Distribuição segundo o aparecimento de sintomas respiratórios no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação ao tipo de parto na cidade de Manaus – AM, 2005.

Dentre as dezesseis crianças sintomáticas, oito eram de mães com teste positivo para *Chlamydia trachomatis*, e destas quatro (50%) nasceram de parto vaginal e quatro (50%) de parto cesariano.

Dentre os sintomas respiratórios, obstrução nasal, coriza, tosse, taquidispnéia, observamos significância estatística em todas sendo a de maior risco relativo, a tosse (tabelas 17, 18, 19 e 20).

Exposição a <i>Chlamydia</i>	Obstrução nasal				Total
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
SIM	7	46,7	3	4,2	10
NÃO	8	53,3	69	95,8	77
Total	15	17,2	72	82,8	87

RR = 6,7; IC95% (3,1 – 14,6)

Tabela 17 - Incidência de obstrução nasal no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação à exposição a *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus – AM, 2005.

Como podemos observar os recém-nascidos expostos a *Chlamydia trachomatis* têm 6,7 vezes mais chance de desenvolver obstrução nasal.

Exposição a <i>Chlamydia</i>	Coriza				Total
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
SIM	5	50,0	5	6,5	10
NÃO	5	50,0	72	93,5	77
Total	10	11,5	77	85,5	87

RR = 7,7; IC95% (2,7 – 22,0)

Tabela 18 - Incidência de coriza no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação à exposição a *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus – AM, 2005.

Como podemos observar os recém-nascidos expostos a *Chlamydia trachomatis* têm 7,7 vezes mais chance de desenvolver coriza.

Exposição a <i>Chlamydia</i>	Tosse				Total
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
SIM	7	77,8	3	3,8	10
NÃO	2	22,2	75	96,2	77
Total	9	10,3	78	89,7	87

RR = 27,0; IC95% (6,5 – 112,2)

Tabela 19 - Incidência de tosse no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação à exposição a *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus – AM, 2005.

Como podemos observar os recém-nascidos expostos a *Chlamydia trachomatis*, têm 27 vezes mais chance de desenvolver tosse.

Exposição a <i>Chlamydia</i>	Taquidispnéia				Total
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
SIM	2	66,7	8	9,5	10
NÃO	1	33,3	76	90,5	77
Total	3	3,4	84	96,6	87

RR = 15,4; IC95% (1,2 – 565,5)

Tabela 20 - Incidência de taquidispnéia no coorte de crianças acompanhadas do nascimento aos sessenta dias de vida, em relação à exposição a *Chlamydia trachomatis*, na cidade de Manaus – AM, 2005.

Como podemos observar os recém-nascidos expostos a *Chlamydia trachomatis* ao nascimento, têm 15,4 vezes mais chance de desenvolver taquidispnéia.

5.3 DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisadas 100 gestantes no terceiro trimestre que procuraram espontaneamente o ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes. A prevalência de infecção por *Chlamydia trachomatis* encontrada nesta população foi de 11%, sendo que nos trabalhos anteriores encontrados na literatura regional de Alencar *et al.*, 1993 e Santos *et al.*, 2003, na cidade de Manaus em

mulheres sexualmente ativas foi de 27,1% e 20,7% respectivamente, sendo o método diagnóstico utilizado a imunofluorescência indireta no primeiro estudo e a PCR no segundo. Na literatura não há relatos de estudos de prevalência de *Chlamydia trachomatis* em gestantes realizados em nossa região. É provável que a incidência mais baixa encontrada neste trabalho esteja relacionada às características da população estudada, em que 89% (89/100) referiram ter união estável, 97% (97/100) referiram ter um único parceiro no último ano e 46% (46/100) tinham ensino médio completo.

No Brasil temos poucos trabalhos realizados nesta população, porém em um estudo realizado na cidade de Fortaleza-CE encontrou-se uma prevalência também de 11% nas gestantes estudadas, sendo utilizado na pesquisa o método da PCR (MARTINS *et al.*, 2004). Também em gestantes e pelo mesmo método diagnóstico, Leite (2001) em sua dissertação de mestrado, observou uma prevalência de 10,2% em Belo Horizonte-MG. A prevalência encontrada no presente estudo coincide com os trabalhos citados.

A OMS estima que 340 milhões de novos casos de doenças sexualmente transmissíveis curáveis (gonorréia, infecção por *chlamydia*, sífilis e trichomoníase) ocorram a cada ano, sendo 75 a 85% destes em países em desenvolvimento. Esta importância tem sido largamente reconhecida desde o advento da epidemia da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), e há boas evidências de que o controle de doenças sexualmente transmissíveis poderá reduzir a transmissão do HIV (MAYAUND & MABEY, 2004). Uma prevalência relativamente alta como a de 11% encontrada neste trabalho, pode significar que esta população tem risco de contrair outras doenças sexualmente transmissíveis, inclusive a AIDS.

O presente trabalho mostrou uma maior ocorrência em mulheres menores de 25 anos, (média $23,5 \pm 4,5$) porém não houve significância estatística, talvez pelo fato da população atendida ser predominantemente jovem (média 25,9 anos) e também pelo tamanho da amostra. Esses dados são compatíveis com a maioria dos trabalhos que relatam a prevalência da infecção numa faixa etária jovem, menor de 25 anos (WEINSTOCK *et al.*, 1994; CDC, 2003).

Também foi observado que 100% das gestantes apresentavam secreção vaginal ao exame especular, porém o dado clínico que mostrou alguma significância estatística foi o achado de sinais clínicos de cervicite e a presença de secreção endocervical, o que corresponde a descrições da literatura sobre a validação do fluxograma de corrimento vaginal em gestantes, o qual faz uma abordagem sindrômica e é recomendado pela OMS desde 1991 e também pelo Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde no Brasil

(MENEZES & FAÚNDES, 2004; URQUÍA *et al.*, 2004).

O caráter assintomático ou de sintomatologia inespecífica com que a infecção clamidial pode cursar em grande parte das mulheres faz-se necessário um diagnóstico laboratorial de alta sensibilidade para diagnóstico e controle de complicações, já que é uma doença facilmente curável quando diagnosticada. A escolha do método da PCR para o diagnóstico no presente trabalho está fundamentada na alta sensibilidade e especificidade do método.

Postma *et al.*, 2000, em um trabalho de revisão sistemática, fizeram um estudo sobre custo-benefício de uma investigação de infecções assintomáticas por *Chlamydia trachomatis* em gestantes e concluem que há benefícios em termos de custos e recomendam a investigação se a prevalência de *C. trachomatis* em gestantes for 3% ou mais (<http://www.cochrane.bireme.br>, acesso em 17/07/2003).

Neste estudo não houve diferença estatisticamente significante em relação ao número de parceiros relatados no último ano, talvez este resultado seja devido ao tamanho da amostra, porém também se questiona o possível papel do parceiro como perpetuador da cadeia de transmissão da doença.

Também o grau de escolaridade não teve, no presente estudo, associação com a positividade dos exames para *Chlamydia trachomatis*.

No presente trabalho foi observado um percentual grande de história de aborto: trinta e três por cento das pacientes. Ao contrário do que sugere a literatura, neste estudo este fato não demonstrou estar relacionado à positividade da infecção por *Chlamydia*. O aborto espontâneo foi o mais relatado (81,8%), fato este que merece um estudo posterior para buscar causas já que este percentual alto pode representar uma morbidade materna não diagnosticada. Por outro lado, talvez a gravidez indesejada e suas repercussões estejam ocultas nestes dados, o que pode representar um importante problema em saúde pública gerando gastos para o estado.

Segundo dados do DATASUS, os valores gastos com internações hospitalares por aborto espontâneo em Manaus, em Julho de 2005, perfazem um total de R\$ 54.983,48, sendo que este valor representa 9% das despesas gastas com parto único espontâneo e 5,6% das despesas com internações referentes à gravidez, parto e puerpério. (<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miam.def>).

Entre as 100 mulheres que participaram do estudo, oito no terceiro trimestre de gestação ainda não tinham um resultado de triagem para sífilis em seu prontuário, exame de grande importância para prevenção de morbi-mortalidade neonatal associadas a doenças sexualmente transmissíveis curáveis. Isto pode sugerir algum grau de deficiência no

atendimento às gestantes ou ao acesso destas aos exames laboratoriais.

Houve uma gestante com resultado positivo para *Chlamydia* que evoluiu com feto natimorto, porém não podemos afirmar que este fato estaria relacionado à infecção materna por falta de exames comprobatórios no recém-nascido.

Em uma outra gestante também com exame positivo, cujo parto foi cesariana, houve achado cirúrgico de aderências pélvicas e fator tubário, o que poderia ser uma consequência de uma possível infecção crônica que tivesse evoluído com doença inflamatória pélvica corroborando com dados da literatura (JOLANDE & JOHANNES, 2002).

No presente estudo não foi encontrada relação da infecção materna por *Chlamydia trachomatis* com prematuridade como sugerem alguns trabalhos na literatura mundial (GENCAY , 2000; GENCAY *et al.*, 2001; NUMAZAKI *et al.*, 2003). Porém, Paul *et al.*, 1999, também não encontrou associação significativa com prematuridade e baixo peso ao nascer.

Também não houve relação da positividade do exame com ruptura prematura de membrana amniótica como sugere o trabalho de Mårdh, 2002.

Além disso, diferentemente do que refere a literatura não houve relação entre o tipo de parto e o aparecimento de sintomas respiratórios sugerindo que, talvez, a infecção perinatal possa ocorrer ainda intra-útero como sugerem alguns trabalhos (DONG *et al.*, 1998; GENCAY *et al.*, 2001).

Houve associação entre a exposição do recém-nascido à infecção materna por *Chlamydia* e o aparecimento de sintomas respiratórios no pequeno lactente até sessenta dias de vida, tendo como o sintoma de maior valor de associação à tosse.

Estes dados mostram a grande importância na investigação sistemática de doenças sexualmente transmissíveis curáveis em populações de risco, como uma das medidas clínicas importantes para diminuir a transmissão vertical e as complicações desta patologia e outras etiologias de doenças sexualmente transmissíveis curáveis, as quais, segundo a OMS (MAYAUD & MABEY, 2004) podem representar o risco maior na contribuição da epidemia da AIDS.

6. CONCLUSÃO

- ✓ A prevalência encontrada foi de 11% nas gestantes no terceiro trimestre atendidas no pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes, no período de 10 de Janeiro a 30 de Junho de 2005, em Manaus-AM.
- ✓ A infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, no presente trabalho, não apresentou associação estatisticamente significativa em relação a prematuridade e baixo peso ao nascer.
- ✓ Não houve relação da infecção materna por *Chlamydia trachomatis*, com ruptura prematura de membranas amnióticas.
- ✓ Foi alta a ocorrência de história anterior de aborto espontâneo na população estudada, não tendo este fato, relação com a positividade da *Chlamydia*.
- ✓ Houve associação significativa em relação ao aparecimento de sintomas respiratórios em recém-nascidos expostos à infecção materna por *Chlamydia trachomatis*.
- ✓ O tipo de parto (vaginal ou cesariano) não influenciou no aparecimento de sintomas respiratórios nos recém-nascidos.
- ✓ O sintoma que mostrou ter maior valor de associação foi a tosse, ou seja, os filhos de mães infectadas por *C. trachomatis*, têm 27 vezes maior probabilidade de apresentarem sintomatologia de tosse nos primeiros sessenta dias de vida .
- ✓ A taquidispnéia mostrou-se freqüente entre os recém-nascidos de mães com PCR positiva para *C. trachomatis*, evidenciando um Risco relativo (RR) de 15,4.
- ✓ A PCR para *C. trachomatis*, utilizando os *primers* que amplificam o DNA plasmidial, mostrou-se bastante eficaz para a detecção do patógeno, podendo ser utilizada nos serviços de investigação diagnóstica de doenças sexualmente transmissíveis.

- ✓ Mais programas de investigação das doenças sexualmente transmissíveis curáveis, devem ser implementados em nosso meio para o possível controle das mesmas, favorecendo a interrupção da transmissão, evitando o desenvolvimento de doenças e suas complicações e prevenindo a transmissão vertical e suas conseqüências.

7. BIBLIOGRAFIA

7.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALENCAR, A.A.F.; FERREIRA, L.C.L.; LOUREIRO, J.A.S. Detecção de *Chlamydia trachomatis* por imunofluorescência direta em esfregaços endocervicais. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 103, n. 6, p. 199-203, 1993.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, n. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ARANGO, H. G. **Bioestatística Teórica e Computacional**. Ed. Guanabara Koogan, 2001.
- BARON, Samuel. *Chlamydia*. **Medical Microbiology**, 4th Edition, section 1. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..Section&rid=mmed.chapte...> >acesso em: 19 Jun. 2003.
- BAUER, H. M.; MANOS, M. M. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. In: **Applications – Viral Pathogens**, p. 407-413, 1998.
- BENNETT, J.C. *et al.* **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 20^o Edição. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro – RJ, v. 2, p. 1899-1912, 1997.
- BERQUÓ, E. S.; Souza, J. M. P.; Gotlieb, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo: EPU, 1980.
- BLACK, M. C. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. **Clinic Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 160-184, 1997.
- CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Division of Sexually Transmitted Diseases. April, 2001. Disponível em: http://www.cdc.gov/nchstp/dstd/Fact_Sheets/chlamydia_facts.htm, acesso em: 22 Jun. 2003.
- CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. **Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2002**. MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report, v. 51, n. RR-6, Maio de 2002.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention. **Screening Test to Detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* Infections.** MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report., v.51, n. RR-15, Outubro de 2002.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2001 Supplement. **Chlamydia Prevalence Monitoring Project.** Annual Report 2001. Division of STD Prevention. Outubro 2002.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Disease Surveillance 2003 Supplement. **Chlamydia Prevalence Monitoring Project.** Annual Report 2003. Division of STD Prevention. Outubro, 2004.

CDC. Centers for Disease and Prevention. **STDs & Pregnancy CDC Fact Sheet.** Disponível em: http://www.cdc.gov/std/healthcomm/fact_sheets.htm, acesso em 02.08.2005.

CHOUT, R.; VATON, S.; QUIST, D.; et al. Improvement of cervical *Chlamydia* Detection in Asymptomatic Family Planning Attendees by using AmpliCor *Chlamydia trachomatis* Assay. **Cell Mol Biol**, v. 41, n. 5, p. 731-736, 1995.

DATASUS – Tecnologia da Informação a serviço da Saúde. Morbidade Hospitalar do SUS – por Local de Internação – Amazonas. Valor Total por Microregião segundo Lista Morbidade CID-10. Município: Manaus. Capítulo CID-10: XV. Gravidez Parto e Puerpério. Período: Julho/2005. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/miam.def.>, acesso em: 05.09.2005.

DEBATTISTA, J.; TIMMS, P.; ALLAN, J.; ALLAN, Janet. Immunopathogenesis of *Chlamydia trachomatis* Infections in Women. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 6, p. 1273-1287, 2003.

DJUKIC, S.; NEDELIJKOVIC, M.; PERVULOV, M.; LJUBIC, A.; RADUNOVIC, N.; LAZAREVIC, B. Intra-amniotic *Chlamydia trachomatis* infection. **Gynecology Obstet Invest**, v. 42, n. 2, p. 109-112, 1996.

DOMEIKA, M., BASSIRI m., MÅRDH. Diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic males by testing urine by PCR. **J. Clin Microbiol**, v. 32, n. 10, p. 2350-2352, 1994.

DONG, Z. W.; LI, Y.; ZHANG, L. Y.; LIU, R. M. Detection of *Chlamydia trachomatis* Intrauterine Infection Using Polymerase Chain Reaction on Chorionic Villi. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, n. 61, p. 29-32, 1998.

EPI-INFO, Versão 3.3 for Windows, produzido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Controle de Doenças – CDC, Califórnia, Janeiro de 1997.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. LUMMA Consultoria, Projetos e Informática Brasília: **EMBRAPA**, p. 220, 1995.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**, 5ª ed. Porto Alegre, Ed. Artmed, 2002.

JOLANDE, A. L.; JOHANNES, L. H. E. *Chlamydia* Infection and Subfertility. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 901-912, 2002. Disponível em: <http://www.ideallibrary.com>., acesso em: 23.05.2005.

GEERLING, S.; NETTUM, J. A.; LINDNER, L. E.; MILLER, S. L.; DUTTON, L.; WECHTER, S. Sensitivity and Specificity of the Papanicolaou-stained cervical smear in the diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection. **Acta Cytologica**, n. 29, p. 671-675, 1985.

GENCAY, M.; KOSKINIEMI, M.; AMALA, P.; FELLMAN, V.; NARVANEM, A.; WAHLSTROM, T.; VAHERI, A.; PUOLAKKAINEN, M. *Chlamydia trachomatis* seropositivity is associated both with stillbirth and preterm delivery. **APMIS**, v. 108, n. 9, p. 584-588, 2000.

GENCAY, M.; KOSKINIEMI, M.; FELLMAN, V.; AMMALA, P.; VAHERI, A. PUOLAKKAINEN, M. *Chlamydia trachomatis* Infection in Mothers with Preterm Delivery and in their Newborn Infants. **APMIS**, v. 109, n. 9, p. 636-640, 2001.

GOH, B. T.; FORSTER, G. E. Sexually Transmitted diseases in Children: chlamydial oculo-genital infection. **Genitourin Med.**, v. 69, p. 213-221, 1993.

GRIFFAIS R., THIBON, M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by Polimerase Chain Reaction. **Res Microbiol**, n. 140, p. 139-141, 1989.

GUASCHINO, S. AND SETA, F., Update on *Chlamydia trachomatis*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 900, p. 293-300, 2000.

HAMMERSCHLAG, m. R. Chlamydial Infections. **The Journal of Pediatrics**, v. 114, n. 5, p. 727-734, 1989.

ISHAK, M. DE O. G.; MUMTAZ, G.; ISHAK, R.; RIDGWAY, G. Prevalência de Anticorpos para *Chlamydia trachomatis* em Grupos populacionais do Brasil, Inglaterra e Portugal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 1, p. 40-44, 1988.

JONES, R. B. Chlamidial Diseases. In: Mandell, G. L.; BENNET, J. E.; DOLIN, R. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 4º ed. New York:Churchill Livingstone, p. 1676-1689, 1995.

KINNUNEN, A.; MOLANDER, P.; MORRISON, R.; LEHTINEN, M.; KARTTUNEN, R.; TIITINEN, A.; PAAVONEN, J.; SURCEL, H.-M. Chlamydial Heat Shock Protein 60-Specific T Cells in Inflamed Salpingeal Tissue. **Fertility And Sterility**, v. 77, n. 1, p. 162-166, 2002.

KINNUNEN, A.; SURCEL, H.-M.; HALTTUNEN, M.; TIITINEN, A.; MORRISON, R. P.; MORRISON, S. G.; KOSKELA, P.; LEHTINEN, M.; PAAVONEN, J. *Chlamydia trachomatis* Heat Shock Protein-60 Induced Interferon- γ and Interleukin-10 Production in Fertile Women. **Clin Exp Immunol**, n. 131, p. 299-303, 2003.

LEITE, R.C.S. Infecção Cervical Causada por *Chlamydia trachomatis* em Gestantes: Prevalência e Fatores de Risco. **Rev. Brasileira Ginecologia e Obstetrícia**. [online].2001, Fev; vol. 23 (1):58-58. Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032001000100014&Ing=pt&nrm=iso., acesso em: 21.08.2005.

LOOMIS, W. P.; STARNBACH, M. N. T Cell responses to *Chlamydia trachomatis*. **Current Opinion in Microbiology** n. 5, p. 87-91, 2002.

MAHONY, J. B.; LUINSTRA, K. E.; SELLORS, J. W.; JANG, D.; CHERNESKY, M. A. Confirmatory polimerase chain reaction testing for *Chlamydia trachomatis* in first-void urine from assyntomatic and syntomatic men. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2241-2245, 1992.

MAHONY, J. B.; LUINSTRA, K. E.; SELLORS, J. W.; CHERNESKY, M. A. Comparison of Plasmid- and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assays for Detecting *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1753-1758, 1993.

MÅRDH, Per- Anders. Influence of infection with *Chlamydia trachomatis* on pregnancy outcome, infant health and life-long sequelae in infected offspring. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 16, n. 6, p. 847-864, 2002.

MARTINS, T. A. *et al.* As Doenças Sexualmente Transmissíveis são Problemas entre Gestantes no Ceará? **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.16, n. 3, p. 50-58, 2004.

MAYAUD, P.; MABEY, D. Approaches to the Control of Sexually Transmitted Infections in Developing countries: Old problems and Modern Challenges. **Sexually Transmitted Infections**, n. 80, p. 174-182, 2004. Disponível em:

<http://sti.bmjournals.com/cgi/content/full/80/3/174>, acesso em 30/08/2005.

MENEZES, M. L.; FAÚNDES, A. E. Validação do Fluxograma de Corrimento Vaginal em Gestantes. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 16, n. 1, p. 38-44, 2004.

MIRANDA, A. E.; GADELHA, A.; PASSOS, M. R. L. Impacto da Infecção pela *Chlamydia trachomatis* na Saúde Reprodutiva. **J Bras Doenças Sex Transm**, v. 15, n. 1, p. 53-58, 2003.

MOULDER, J. W. Interaction of Chlamydiae and Host Cells In Vitro. **Microbiological Reviews**, p. 143-190, Mar 1991.

NGASSA, P.C.; EGBE, J.A. Maternal genital *Chlamydia trachomatis* infection and the risk of preterm labor. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 47, n. 3, p. 241-246, 1994.

NIIDA, Y.; NUMAZAKI, K.; IKEHATA, M.; UMETSU, M.; MOTOYA, H. AND CHIBA, S. TWO FULL-TERM INFANTS WITH *Chlamydia trachomatis* pneumonia in early neonatal period. **Europe Journal Pediatric**, v. 157, p. 950-1, 1998.

NUMAZAKI, K. and NIIDA, Y. Two cases of intrauterine *Chlamydia trachomatis* Infection. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**, v.18, p.6-8, 2000.

NUMAZAKI, K.; ASANUMA, H.; NIIDA, Y. *Chlamydia trachomatis* infection in early neonatal period. **BMC Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, 2003. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/3/2>>, acesso em: 26 Jun. 2003.

PAUL, V.K.; SINGH, M.; GUPTA, U.; BUCKSHEE, K.; BHARGAVA, V.L.; TAKKAR, D.; NAG, V.L.; BHAN, M.K.; DEORARI, A.K. *Chlamydia trachomatis* infection among pregnant women: Prevalence and prenatal importance. **The National Medical Journal of India.**, v. 12, n. 1, p. 11-14, 1999.

PERSING, D. H. In vitro Nucleic Acids amplification techniques. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WRITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology**. Washington Mayo Foundation Rochester. 1993.

PONTES, I.M.; ÂNGELO, P. C. S.; ASTOLFI FILHO, S., Desenvolvimento de Novos Marcadores Microsatélites para Análise Genética em Humanos. **A Amazônia na Era Genômica e Pós-Genômica**, Livro de Resumos do 4º Encontro de Genética do Amazonas, p. 79, 2003.

POSTMA, M. J. *et al.*, Screening for Asymptomatic *Chlamydia trachomatis* Infection in Pregnancy. Cost-effectiveness Favorable at a Minimum Prevalence Rate of 3% or More. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, v. 144, n. 49, p.2350-2354, 2000. Disponível em: http://cochrane.bireme.br/cochrane/show.php?db=eed_abstracts&id=&lang=pt... acesso em 17.07.2003.

QUINN, T. C.; GAYDOS, C.; SHEPHERD, M.; BOBO, L.; HOOK III, E. W.; VISCIDI, R.; ROMPALO, A. Epidemiologic and Microbiologic Correlates of *Chlamydia trachomatis* Infection in Sexual Partnerships. **JAMA**, v. 276, n. 21, p. 1737-1742, 1996.

ROOSENDAAL, R. *et al.* Comparison of Different primer sets for detection of *Chlamydia trachomatis* by the Polymerase Chain Reaction. **J. Med. Microbiology**, v. 38, p. 426-433, 1993.

ROTTENBERG, M. E.; GIGLIOTTI-ROTHFUCHS, A.; WIGZELL, H. The Role of IFN- γ in Outcome of Chlamydial Infection. **Current Opinion in Immunology**, n. 14, p. 444-451, 2002.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a laboratory Manual**, New York, 2ª Edição. Cold Spring Harbor Lab. USA, Appendix E: E.3, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. Sequencing with Chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, C.; TEIXEIRA, F.; VICENTE, A.; ASTOLFI FILHO, S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Smears of Sexually Active Women in Manaus, Brazil, by PCR. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, V. 7, n. 2, p. 91-95, 2003.

SCHACHTER, J. and STAMM, W. E. *Chlamydia*. In: **Manual of Clinical Microbiology**, Washington, D. C., , p. 795-806, 1999.

SEADI, C. F.; ORAVEC, R.; POSER, B.; CANTARELLI, V. V.; ROSSETTI, M. L. Diagnóstico Laboratorial da Infecção pela *Chlamydia trachomatis*: vantagens e desvantagens das técnicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, p. 125-133, 2002.

SMITH, J. R.; TAYLOR-ROBINSON, D. Infection due to *Chlamydia trachomatis* in Pregnancy and the newborn. **Baillieres Clinic Obstetric Gynaecology**, v. 7, n. 1, p. 237-255, 1993.

STEPHENS, R; LAMMEL, C. J.; *Chlamydia* outer membrane protein discovery using genomics. **Current Opinion in Microbiology**, n. 4, p. 16-20, 2001.

TAM, J.E.; DAVIS, C.H.; THERESHER, R.J.; WYRICK, P.B. Short Communications. Location of the Origin of Replication for the 7,5-kb *Chlamydia trachomatis* Plasmid. **Plasmid**, n.27, p.231-236, 1992.

URQUÍA, M. A. *et al.*, Manejo Sindromico de Flujo Vaginal y Dolor Abdominal Bajo em Honduras: Validación de Flujoigramas. **DST – Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.16, n.1, p. 5-16, 2004.

VERINGA, E. M.; ZUYDERWIJK, M. A. M.; SCHELLEKENS, H. Detection of *Chlamydia trachomatis* in Clinical Specimens. Comparison of Culture, Ddirect Antigen Detection, DNA Probe Hibridization and PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 19, p. 117-125, 1994.

WANGS, S. P. **et al.** A simplified method of immunological typing of trachoma-inclusion conjunctivitis-lymphogranuloma venereum organisms. **Infectious Immunology**, 1973, n. 7, p. 356-360.

WEINSTOCK, H.; DEAN, D.; BOLAN, G. *Chlamydia trachomatis* infections. **Infectious Diseases Clinics of North America**, v. 8, n. 4, p.797-819, 1994.

WU S.; SHEN L.; LIU G. Study on Vertical Transmission of *Chlamydia trachomatis* using PCR and DNA sequencing. **Chinese Medical Journal**, v. 112, n. 5, p. 396-399, 1999.

8. ANEXOS

8.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INVESTIGADOR: Dra. Ana Paula Bomfim de Borborema Alfaia

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Amazonas

TELEFONE: 8121 1963

TÍTULO: Infecção por *Chlamydia trachomatis* em Gestantes: Prevalência e Importância Pré-Natal.

DESCRIÇÃO E OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo é investigar a presença de *Chlamydia trachomatis* em mulheres gestantes no terceiro trimestre no ambulatório de pré-natal de baixo risco do Hospital Universitário Dona Francisca Mendes na cidade de Manaus-AM, através do método da PCR, visando estimar a prevalência da infecção na população pesquisada.

Eu recebi a explicação de que eu serei uma das pacientes participantes do projeto. Minha participação será absolutamente voluntária. Este estudo foi desenhado para avaliar quantas mulheres do grupo em estudo são portadoras de *Chlamydia trachomatis* e assim determinar a prevalência da infecção. Se eu voluntariamente concordar, eu permitirei a coleta do material endocervical para realização da PCR. Nem diferentes testes laboratoriais serão realizados, nem precisarei de hospitalização. Além das amostras coletadas, serei questionada sobre mim mesmo no que se refere a algumas questões de saúde e condições de vida.

Fui informada também que meu filho também será acompanhado clinicamente a partir do primeiro dia de vida até os três meses, podendo entrar em contato com a Dra Ana Paula a qualquer momento se houver necessidade.

RISCOS ASSOCIADOS AO ESTUDO

Retirada da amostra endocervical: o seu maior desconforto é no momento da introdução do espécúlo vaginal.

BENEFÍCIOS

Participando neste estudo, estarei me beneficiando por está sendo verificado a presença ou não da *Chlamydia trachomatis*, que pode causar problemas tanto para mim quanto para meu filho. Além disso, estarei contribuindo para o conhecimento de quantas pessoas são afetadas por este tipo de

doença. Caso o exame seja positivo, deverei ser avisada e encaminhada para tratamento, assim como meu filho que deverá ser acompanhado por um pediatra.

CONFIDENCIALIDADE E AVALIAÇÃO DOS REGISTROS

Minha participação neste estudo será confidencial e os registros ou resultados ao estudo serão divulgados ao nível científico e autoridades de saúde pública a fim de que sejam tomadas atitudes que garantam a saúde da população.

Minha identidade permanecerá sempre em confidencialidade.

DIREITO A RETIRADA DO ESTUDO

Eu tenho direito de fazer qualquer pergunta referente aos riscos potenciais ou conhecidos para mim durante minha participação neste estudo.

Eu serei notificada com referência a qualquer nova informação relacionada com o estudo, eu serei capaz de contatar a Dra. Ana Paula Borborema Alfaia, cujo número de telefone é 8121 1963.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A minha participação neste estudo é voluntária. Se eu recusar a participação neste estudo, não haverá qualquer tipo de retaliação ou perda de benefícios a que tenha direito.

Eu tenho o direito de manter uma cópia assinada deste documento

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras, eu concordo com minha participação no estudo.

_____	_____
Assinatura do Paciente do Estudo	Data
_____	_____
Assinatura da Testemunha	Data
_____	_____
Assinatura do Investigador	Data

8.2 QUESTIONÁRIO

01.	Informações sobre o estudo e confiabilidade do estudo e TCLE	
Informações Pessoais		
02.	Nome: _____	03. Idade: _____ anos
04.	Bairro: _____	Tel p/ contato: _____
05.	Estado Marital: <input type="checkbox"/> solteira <input type="checkbox"/> união estável <input type="checkbox"/> divorciada/separada <input type="checkbox"/> viúva	06. Grau de Instrução: <input type="checkbox"/> sem instrução <input type="checkbox"/> Fundamental incompleto <input type="checkbox"/> Fundamental completo <input type="checkbox"/> Médio incompleto <input type="checkbox"/> Médio completo <input type="checkbox"/> Superior incompleto <input type="checkbox"/> Superior completo
07.	Renda Familiar: <input type="checkbox"/> 1 salário mínimo <input type="checkbox"/> 2-4 salários mínimos <input type="checkbox"/> 5-6 salários mínimos <input type="checkbox"/> acima de 6 salários mínimos	
08.	Doenças anteriores à gestação: <input type="checkbox"/> herpes <input type="checkbox"/> bartolinite <input type="checkbox"/> sífilis <input type="checkbox"/> ITU repetição <input type="checkbox"/> condilomatose vulvar <input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> gonorréia <input type="checkbox"/> outras _____ cirurgias anteriores _____	
09.	Qual o número de parceiros sexuais no último ano? <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> + de 3	
10.	Nº Gestações: _____ Paridade: _____	Aborto: <input type="checkbox"/> espontâneo <input type="checkbox"/> provocado IG: _____
11.	Nascidos Vivos _____ Prematuro? _____ Algum problema neonatal? <input type="checkbox"/> distúrbio respiratório <input type="checkbox"/> conjuntivite (nas gestações anteriores) <input type="checkbox"/> rinite <input type="checkbox"/> icterícia Natimorto? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Quantos? _____ <input type="checkbox"/> infecção <input type="checkbox"/> outros: _____	
12.	Fez algum tratamento para engravidar? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não	
13.	Último preventivo em: ____/____/____ Resultado: _____	
14.	Fez Pré-natal? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não nº consultas _____	
15.	Você teve alguma infecção durante a gestação? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não Qual? _____	
16.	Tem corrimento? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não Qual a cor? <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> amarelado <input type="checkbox"/> sanguinolento Qual o odor? <input type="checkbox"/> inodoro <input type="checkbox"/> fétido	
17.	Exames realizados durante a gravidez: • VDRL <input type="checkbox"/> reativo _____ <input type="checkbox"/> negativo <input type="checkbox"/> não fez • HIV <input type="checkbox"/> reativo <input type="checkbox"/> não reativo <input type="checkbox"/> teste rápido <input type="checkbox"/> Elisa <input type="checkbox"/> W. Blot	
COLETA DO MATERIAL		
18.	Quem coletou? _____	
19.	Exame especular: <input type="checkbox"/> ectopia <input type="checkbox"/> colo sangrante <input type="checkbox"/> cervicite <input type="checkbox"/> secreção endocervical <input type="checkbox"/> secreção vaginal? Características: <input type="checkbox"/> branco <input type="checkbox"/> amarelado <input type="checkbox"/> sanguinolento <input type="checkbox"/> fétido <input type="checkbox"/> inodoro obs: _____	
INTERNAÇÃO		
20.	Data: ____/____/____	Hora: _____
21.	Queixa Principal _____	Quanto tempo? _____
22.	Idade Gestacional: _____	
PARTO		
23.	Data: _____	Hora: _____
24.	<input type="checkbox"/> Cesareana <input type="checkbox"/> vaginal	
25.	Bolsa Rota? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não _____ horas	
26.	Líquido amniótico: <input type="checkbox"/> claro s/grumos <input type="checkbox"/> claro c/grumos <input type="checkbox"/> meconial <input type="checkbox"/> outros: _____	
RECÉM-NASCIDO		
27.	APGAR 1º min _____ 5º _____	
28.	Reanimação? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> sim qual? _____	
29.	Peso: _____ grs Est. _____ cm PC _____ cm	
30.	Há alguma malformação congênita? <input type="checkbox"/> não <input type="checkbox"/> Sim qual? _____	
31.	Capuro somático: _____	
32.	Encaminhado: <input type="checkbox"/> Alojamento conjunto <input type="checkbox"/> Berçário de observação <input type="checkbox"/> Berçário intermediário <input type="checkbox"/> UTI neonatal	
33.	Evolução: _____	
34.	Alta em: ____/____/____ <input type="checkbox"/> com a mãe <input type="checkbox"/> após a mãe	
35.	OBS: _____	

8.3 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprova, em reunião ordinária, realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa intitulado: "Prevalência da infecção por *Chlamydia trachomatis* em gestantes em maternidades públicas de Manaus", da Pesquisadora Responsável, Ana Paula Borbin de Barbosa ARAÚJO.

Em 4º Reunião da Faculdade de Farmácia de Manaus - FEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, em 26 de dezembro de 2009.

Assinatura: _____
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP / UFAM
 Prof. Dr. Paulo Roberto Soares de Melo
 Assessor

8.4 EQUIPE CIENTÍFICA DE APOIO AO DESENVOLVIMENTO DO PLANO DE DISSERTAÇÃO

Nome	Formação (Titulação)	Instituição de trabalho	Experiência em	Atividades no Plano de Dissertação
Spartaco Astolfi Filho	Biólogo, Dr	UFAM	Engenharia Genética	Orientador
Cristina Maria Borborema dos Santos	Farmacêutica, Ms	UFAM	Diagnóstico Molecular	Treinamento e auxílio em técnica de biologia molecular relativa a PCR
Ana Paula Bomfim de Borborema Alfaia	Médica, MD	UFAM	Pediatria/Neonatologia	Coleta do Material. Realização da Técnica PCR. Revisão bibliográfica.
Francisco Carlos Mendes Barbosa	2º grau comp.		Técnico	Auxílio na preparação de meios reagentes.
Enedina Nogueira de Assunção	2º grau comp.	UFAM	Técnicas.	Auxílio na preparação de meios e reagentes
Elza Quadros de Lima	2º Grau	UFAM	Auxiliar Técnica	Auxílio na preparação de meios e reagentes.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)